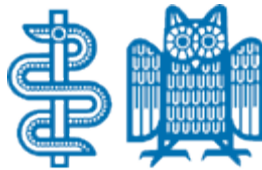


Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

Institut für Infektionsmedizin

Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Univ. – Prof. Dr. med. M. Herrmann



**Prospektive Bedeutung der Multiplex-PCR für die  
moderne *Clostridium difficile* Diagnostik im Vergleich zu  
historischen Daten des UKS (2000 bis 2010)**

**DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZIN  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

**2013**

vorgelegt von Julia Stahlmann

geboren am 29. Januar 1986 in Dresden



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>1 Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Deutsche Fassung .....	1
1.2 Abstract .....	2
<b>2 Einleitung .....</b>	<b>5</b>
2.1 <i>Clostridium difficile</i> .....	5
2.2 Pathogenese von <i>Clostridium difficile</i> .....	10
2.3 Diagnostische Methoden .....	15
2.4 Zielsetzung .....	19
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>20</b>
3.1 Retrospektive Auswertung .....	20
3.2 Prospektive Auswertung .....	20
3.2.1 Antigennachweise .....	21
3.2.2 Anaerobe Kultur .....	21
3.2.3 Surfacelayer-ProteinA-Sequenztypisierung .....	22
3.2.4 Multiplex-PCR für <i>Clostridium difficile</i> .....	22
3.3 Geräte, Reagenzien und Software .....	29
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
4.1 <i>Clostridium difficile</i> Infektionen am UKS 2000 – 2010 .....	34
4.1.1 <i>Clostridium difficile</i> Anforderungen und Befunde .....	34
4.1.2 Patientencharakteristik .....	37
4.1.3 Saisonale Verteilung .....	41
4.1.4 Befunde der verschiedenen Fachrichtungen .....	42
4.1.5 Intensivpatienten .....	49
4.2 Bedeutung von diskrepanten Antigen-Befunden .....	51
4.2.1 Multiplex-PCR aus Nativstuhlproben .....	51
4.2.2 Multiplex-PCR aus <i>Clostridium difficile</i> Isolaten .....	54
4.2.3 Surfacelayer-ProteinA-Sequenztypisierung .....	56

<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>90</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>91</b>



## Abkürzungsverzeichnis

AFLP	amplified fragment length polymorphism
AP	alkalische Phosphatase
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar(e)
BTS	Bakterien-Test-Standard
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
<i>C. sordelli</i>	<i>Clostridium sordelli</i>
CCA	cell cytotoxicity assay
CDI	<i>Clostridium difficile</i> Infektion
CdtLoc	<i>Clostridium difficile</i> (binäres) Toxin Locus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EIA	Enzymimmunoassay
ExoSAP	Exonuclease I - shrimp alkaline phosphatase
GLDH / GDH	Glutamatdehydrogenase
HCCA	alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic acid
HPLC	high performance liquid chromatography
Ig	Immunglobulin
IGS	intergenic spacer
kb	Kilo-Basenpaar
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MLST	multilocus sequence typing
MLVA	multilocus variable-number tandem repeat analysis

NAP	North American pulsed-field type
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NPV	negativer prädiktiver Wert
PaLoc	Pathogenitätslocus
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PFGE	pulsed-field gel electrophoresis
PNM	Primer Nukleotid Mix
PPV	positiver prädiktiver Wert
REA	restriction endonuclease analysis
RFLP	restriction fragment length polymorphism
(r)RNA	(ribosomale) Ribonukleinsäure
slpA	surface layer protein A
slpAST	surface layer protein A gene sequence typing
TBE	Tris-Borat-EDTA
TOF	time of flight
<i>tpi</i>	Triosephosphatisomerasegen
UdS	Universität des Saarlandes
UKS	Universitätsklinikum des Saarlandes

# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Deutsche Fassung

### Einleitung

*Clostridium difficile* ist der häufigste anaerobe Erreger nosokomialer Infektionen. In den vergangenen Jahren kam es zu einer Zunahme an schweren Infektionen, einer epidemischen Ausbreitung neuer hypervirulenter Stämme und parallel zu der damit verbundenen öffentlichen Wahrnehmung auch zu einer vermehrten Anzahl an Anforderungen nach einer schnellen und zuverlässigen *C. difficile* Diagnostik.

### Methoden

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Abschnitte. Retrospektiv erfolgte eine statistische Datenauswertung der Routinestuhluntersuchungen der Jahre 2000 bis 2010 am UKS ( $n = 1507 \pm 721$  Stuhlproben pro Jahr) anhand verschiedener Kriterien nach ihren Häufigkeiten.

Im experimentellen Teil wurden Stuhlproben von Patienten mit Verdacht auf CDI initial durch einen kombinierten GLDH/Toxin-Enzymimmunoassay getestet. Ausgewählte Proben (GLDH positiv / Toxin A/B negativ,  $n = 101$ ) wurden durch voneinander unabhängige Bestätigungstests (Kultur, toxigene Kultur, *slpA*-Sequenztypisierung, Multiplex-PCR) weiter differenziert. Für eindeutig positive bzw. negative Befunde wurde diese Weiterdifferenzierung nicht angestrebt.

### Ergebnisse

Während des Untersuchungszeitraums 2000 bis 2010 wurde einhergehend mit einer zunehmenden Zahl an *C. difficile* Anforderungen, ein Anstieg der CDI Inzidenz gefunden. Es ergab sich außerdem der Anhalt für eine besondere Häufung der CDI, welche im Jahr 2007 gipfelte. Eine altersabhängige Häufung, mit signifikanter Inzidenzzunahme ab dem 70. Lebensjahr, konnte am UKS

nachgewiesen werden, wobei die CDI prinzipiell in allen Altersklassen vertreten war.

Prospektiv konnte für die Mehrzahl der untersuchten Proben eine toxische CDI durch Multiplex-PCR und toxische Kultur diagnostiziert werden. 92 % dieser Proben zeigten in der direkten PCR ein positives Ergebnis für *C. difficile*, wovon wiederum 82 % Toxische aufwiesen. Unter den 31 % Kultur-negativen Proben fanden sich interessanterweise 90 % PCR *C. difficile* positive Befunde.

Außerdem konnte anhand des durch die Multiplex-PCR erhobenen Genprofils eine vorläufige Typisierung erfolgen, die durch Ribotypisierung bei einem Großteil der Proben bestätigt werden konnte.

### Schlussfolgerung

Basierend auf den Ergebnissen dieser Studie wurde folgender diagnostischer Algorithmus für den schnellen und zuverlässigen Nachweis von *C. difficile* entwickelt: Bestehend aus einem GLDH/Toxin-EIA als initialem Suchtest, folgt im Falle diskrepanter Befunde direkt die Multiplex-PCR aus Nativstuhl, welche innerhalb von 24 Stunden Ergebnisse liefert. Auf Grund der hohen Sensitivität sowie Zeit- und Kosteneffektivität wird dieses Vorgehen nun für die *C. difficile* Diagnostik vom *Clostridium difficile* Konsiliarlabor am Universitätsklinikum des Saarlandes empfohlen.

## 1.2 Abstract

### Introduction

*C. difficile* is the most common anaerobic nosocomial pathogen. In the last few years the rising numbers of severe cases and an epidemic spread of new and highly virulent strains associated with more public awareness have spurred optimization of fast and reliable diagnostics for toxigenic infection.

## Methods

The present study basically consists of two components. In the first part of the retrospective single centre study routine stool diagnostics for *C. difficile* of patients with symptomatic disease (n = 1507 +/- 721 stool samples per year) was followed between 2000 and 2010 at the University of Saarland Medical Centre and evaluated on the basis of different criteria.

In the experimental part stool specimens from patients thought to be infected by *C. difficile* were initially screened by a GDH / toxin A/B immunoassay. Selected samples (GDH positive / toxin A/B negative, n = 101) were tested further by culture, toxigenic culture, *slpA* sequence typing and multiplex PCR. For those with clearly positive respectively negative results additional diagnostic testing was not pursued.

## Results

Throughout the study period from 2000 until 2010 an increase of CDI incidence was observed, a finding associated with a larger number of requested tests. Furthermore a special accumulation of CDI cases was found in 2007. It could be confirmed that highest relative abundance of CDI was diagnosed in patients of older age groups, notably from the age of 70. However, clinical relevant infections were found throughout all age groups.

Prospectively toxigenic *C. difficile* infection could be ascertained in most samples by multiplex PCR and toxigenic culture. 92 % of all samples were *C. difficile* positive using direct PCR and 82 % of these PCR positive samples were also positive for *C. difficile* toxin genes. Interestingly among culture-negative samples (31 %) 90 % were tested *C. difficile* positive by multiplex PCR.

Moreover toxinotyping by multiplex PCR of direct stool samples showed a genetic pattern that was highly concordant with the results found by ribotyping.

## Conclusion

Based on the present investigation the following diagnostic algorithm for fast and reliable detection of toxigenic CDI was developed: Using GDH and toxin A/B EIA as an initial screening test, stool samples with discrepant results subsequently undergo direct multiplex PCR. Thus relevant results can be provided within 24 hours. Due to high sensitivity as well as cost effectiveness and low time consumption this multistep algorithm is now recommended for *C. difficile* diagnostics by the national reference laboratory for *C. difficile* at the University of Saarland Medical Centre.

## 2 Einleitung

### 2.1 *Clostridium difficile*

*Clostridium difficile* (Abb. 2-1) ist ein gram-positives, obligat anaerobes Stäbchenbakterium. Es besitzt eine Größe von 2,5 bis 5,9  $\mu\text{m}$  x 0,3 bis 1,5  $\mu\text{m}$  und kann subterminal aerotolerante Sporen ausbilden (Hafiz & Oakley, 1976).

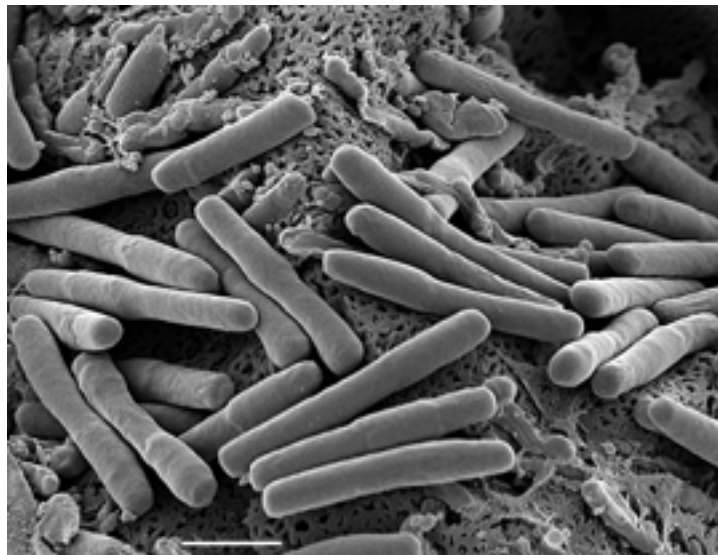


Abb. 2-1 *C. difficile*, rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (Bannert & Madela, 2009)

Die Bezeichnung setzt sich aus dem griechischen κλωστήρ, zu deutsch Spindel, und dem lateinischen difficile, auf Grund der schwierigen Isolation und Kultivierung des Bakteriums, zusammen.

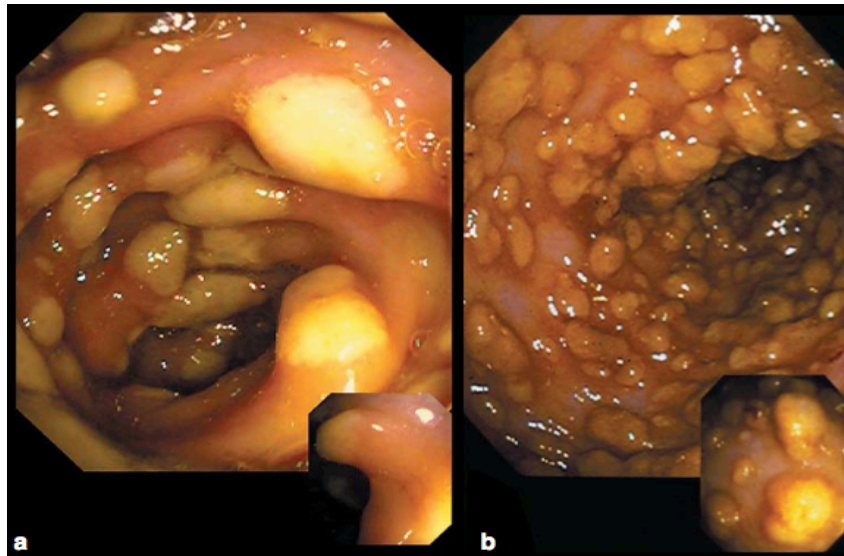
Die Bedeutung von *C. difficile* als Erreger der antibiotikaassoziierten Enterocolitis wurde erstmals 1977 von Bartlett *et al.* beschrieben. Dies gelang ihm zunächst im Zökum von Hamstern, ein Jahr später auch in menschlichem Darm (Bartlett *et al.*, 1977, 1978).

*Clostridium difficile* kommt vor allem im Erdboden oder Oberflächenwasser sowie im Darmtrakt von Lebewesen vor. Die Übertragung findet über die orale Aufnahme

der Sporen statt. Eine Infektion mit *C. difficile* erfolgt in über der Hälfte der Fälle nosokomial; durch Kontakt zu infizierten Personen, über das Pflegepersonal oder diverse kontaminierte Oberflächen (Ackermann, 2004; Simor, 2010). Jedoch kann sie auch ambulant erworben sein. Schwedische und US-amerikanische Studien zeigten, dass dies auf 20 bis 28 % aller CDI Fälle zutrifft (Karlström *et al.*, 1998; Kutty *et al.*, 2010; Norén *et al.*, 2004).

Das klinische Spektrum einer Stuhlbesiedelung mit *Clostridium difficile* ist sehr variabel. Bei fehlender Toxinsynthese durch den Erreger bleiben die Patienten asymptomatisch; 15 bis 70 % der Säuglinge und 5 % gesunder Erwachsener sind klinisch unauffällige *C. difficile* Träger. Im Krankenhaus bleiben etwa 60 % der Patienten, die eine Stuhlbesiedelung mit *C. difficile* erleiden, asymptomatisch (McFarland *et al.*, 1989). Auf Grund einer Infektion mit toxischen Stämmen erfolgt eine symptomatische Manifestation. Meist treten die Symptome innerhalb von zwei Tagen nach der Besiedelung mit dem pathogenen Erreger auf. Gelegentlich kann es jedoch zu einer Verzögerung von bis zu mehreren Wochen kommen. Die Infektion kann blande bis fulminant verlaufen, sie reicht von Diarrhoe (mindestens drei ungeformte Stühle innerhalb von 24 Stunden) über eine einfache Colitis bis hin zur pseudomembranösen Colitis (Abb. 2-2). Die Schwere der Erkrankung wird mitbestimmt durch abdominelle Krämpfe, Fieber, Leukozytose und infolge enteropathischen Proteinverlusts einhergehender Hypalbuminämie. Komplikationen beinhalten rezidivierende CDI, Bakteriämie bis hin zum septischen Schock oder die Ausbildung eines akuten Abdomens. Wesentlich seltener sind extrakolonische Manifestationen in Form von Pseudomembranen des Dünndarms, reaktive Arthritis, Cellulitis, nekrotisierende Faszitis, Osteomyelitis und andere noch seltenere Komplikationen (Bartlett, 2006; McFarland, 2008; Vaishnavi, 2010).





**Abb. 2-2 Pseudomembranöse Kolitis, endoskopischer Befund des Sigma zweier Patienten (Schneider *et al.*, 2007)**

Bei der Erkrankung an einer CDI spielt die individuelle Disposition des Patienten, genauer hohes Alter, Schwere und Anzahl der Komorbiditäten, eine entscheidende Rolle. Mehrere Studien belegen, dass das Risiko an einer CDI zu erkranken ab dem 60. bis 65. Lebensjahr signifikant zunimmt, die Erkrankung schwerer verläuft und mit einer erhöhten Mortalität einhergeht (Bartlett, 2006; Henrich *et al.*, 2009; Karlström *et al.*, 1998). Ist der Patient zudem äußeren Risikofaktoren exponiert, wird die Manifestation einer CDI zusätzlich begünstigt. Unter Anderem gehören hierzu unspezifische Risikofaktoren, wie Länge des Krankenhausaufenthalts, Aufenthalt auf einer Intensivstation, Anlage einer nasogastrischen Sonde und Kontakt zu anderen Personen mit CDI. Damit einher geht das Maß der Einhaltung von Hygienevorschriften des Krankenhauses, das heißt die Verwendung von Einmalhandschuhen, Isolierung der betroffenen Patienten sowie entsprechende Desinfektionsmaßnahmen. Auch endoskopische und chirurgische gastrointestinale Eingriffe werden in der Literatur als Risikofaktoren genannt (Bartlett, 2006; Bignardi, 1998; O'Donoghue & Kyne, 2011; Simor, 2010; Vaishnavi, 2010). Nicht unwesentlicher ist die Verabreichung verschiedener Medikamente und deren Einnahmedauer. Hierzu zählen in erster Linie Antibiotika, sie zerstören die gesunde Mikroflora des Darms und schaffen dadurch einen Selektionsvorteil für *C. difficile*. Die Begünstigung zur Entstehung einer CDI kann

durch jedes Antibiotikum erfolgen. Es werden jedoch immer wieder Studien durchgeführt, um eine aktuelle Hierarchie der antibiotischen Substanzen bezüglich der CDI Entstehung zu erstellen. Vor etwa 15 Jahren führte Bignardi (1998) diesbezüglich eine Metaanalyse durch. Es ergab sich eine statistisch signifikante Assoziation der CDI für Ciprofloxacin, Cefuroxim, Clindamycin, Pristinamycin, Cotrimoxazol und Ceftazidim. Als Faktoren werden deren Pharmakokinetik sowie die Art der Applikation diskutiert. Inzwischen wird eine vorangegangene Therapie mit Flourchinolonen wie Levofloxacin oder Moxifloxacin als bedeutendster Risikofaktor für die Entwicklung einer CDI gesehen (Muto *et al.*, 2005; Pepin *et al.*, 2005). Weitere relevante Medikamente, die eine CDI begünstigen können, sind Immunsuppressiva, durch die eine spezifische IgG-Antwort unterdrückt wird; Antazida wie Protonenpumpeninhibitoren und H<sub>2</sub>-Rezeptorblocker, durch deren Verminderung der Magensäuresynthese den *C. difficile* Sporen das Überleben erleichtert werden soll und Chemotherapeutika wie Cisplatin, Carboplatin oder Methotrexat (Dial *et al.*, 2005; Rupnik *et al.*, 2009; Vaishnavi, 2010).

Die Diagnostik von *C. difficile* und dessen Toxine war Schwerpunkt dieser Arbeit. Aus diesem Grund wird in Punkt 2.3 gesondert darauf eingegangen. Nach einer möglichst raschen Diagnosestellung ist die unverzügliche Einleitung weiterer Maßnahmen für den Therapieerfolg unabdingbar.

Die Therapie der CDI besteht neben dem Absetzen des verordneten Antibiotikums sowie der entsprechenden Symptombehandlung, z. B. durch ausreichende Flüssigkeitszufuhr, Elektrolytausgleich und Spasmolyse, in erster Linie aus der frühzeitigen Einleitung einer wirksamen Antibiose. Metronidazol und Vancomycin haben sich in der Therapie gegen *C. difficile* als besonders effektiv erwiesen. Metronidazol ist vor allem bei milder verlaufender CDI angezeigt, da beide Medikamente hierbei annähernd gleich hohe Ansprechraten zeigen. Dabei ist Metronidazol jedoch kostengünstiger und birgt nicht das Risiko der Verbreitung Vancomycin-resistenter Erreger. Bei schwereren Verläufen sollte oralem Vancomycin der Vorzug gegeben werden, da es in diesen Fällen um knapp 25 % signifikant besser anspricht als Metronidazol, sodass ein schnelleres Therapie-

ansprechen erzielt und ein mögliches Therapieversagen vermieden werden kann (Kelly & LaMont, 2008; Rupnik *et al.*, 2009; Zar *et al.*, 2007). Der letzte Review der Cochrane Collaboration von 2011 (Nelson *et al.*, 2011) zu diesem Thema empfiehlt den Einsatz von Teicoplanin, da es Vancomycin bezüglich der bakteriziden Wirkung signifikant überlegen ist.

Um die Zahl der Ansprechraten zu erhöhen und die der Rezidivraten zu verringern, wird nach neuen Medikamenten gesucht. Nitazoxanid, Rifaximin oder Fidaxomicin zählen zu vielversprechenden neueren Antibiotika, unterliegen jedoch noch Studien. Im Vergleich zu Vancomycin wurde gezeigt, dass das makrozyklische Antibiotikum Fidaxomicin kaum einen Effekt auf die normale Darmflora hat. Somit wird das Überleben der *C. difficile* Sporen erschwert und die Rezidivraten vermindert (Cornely *et al.*, 2012; Louie *et al.*, 2011; Shah *et al.*, 2010; Tannock *et al.*, 2010).

Die Behandlung von Komplikationen umfasst die Änderung des Antibiotikaregimes oder eine Kombinationstherapie von oralem Vancomycin mit neueren Antibiotika bei rezidivierender CDI (Kelly & LaMont, 2008). Bei Ileuspatienten sollte auf Grund der gestörten Magen-Darm-Passage die direkte Instillation von Vancomycin in den Darm erfolgen (Gerding *et al.*, 2008). Patienten mit fulminanten Verläufen sollten intensivmedizinisch überwacht werden, evtl. muss eine Kolektomie erwogen werden. Die Indikation zur chirurgischen Intervention muss jedoch streng gestellt werden, da eine postoperative Letalität von über 50 % besteht. Entscheidende Faktoren sind hierbei das Alter des Patienten und die präoperative Erfordernis an Vasopressoren (Dallal *et al.*, 2002).

Die Therapie der CDI mit nicht-antibiotischen Mitteln wird nach wie vor diskutiert, konnte aber noch nicht hinreichend belegt werden. Deren Ansätze beinhalten die aktive und passive Immunglobulingabe, monoklonale Antikörper, toxinbindende Agenzien wie Cholestyramin oder Tolevamer, Stuhltransplantation, Verabreichung von nicht toxischen *C. difficile* Stämmen, Aminosäurenersatz und –restriktion sowie Probiotikaeinsatz (Thompson, 2008).

## 2.2 Pathogenese von *Clostridium difficile*

Die Ausbildung einer *C. difficile* Infektion kann nur nach oraler Aufnahme des Erregers bzw. der Sporen erfolgen. Nach der Chemotaxis vom Lumen zur Darmschleimhaut folgt im terminalen Ileum und Zökum u. a. mit Hilfe von Flagellen die Adhäsion an Enterozyten. Das Bakterium selbst dringt nicht in die Wirtszelle ein, sondern lediglich dessen Toxine (Borriello, 1998; Tasteyre *et al.*, 2001). Für den Nachweis der entsprechenden Gene stehen PCR-basierte Verfahren zur Verfügung, welche in dieser Arbeit zur genaueren Analyse der isolierten *C. difficile* Stämme Verwendung fanden.

### Pathogenitätslocus

Die Gene für Toxin A und B, *tcdA* und *tcdB*, befinden sich auf dem Pathogenitätslocus (PaLoc), einem 19,6 kb großen Genabschnitt (Abb. 2-3). Die Toxine A und B selbst bestehen jeweils aus einer C-terminalen Rezeptorbindungs-, einer Translokations- und einer N-terminalen Enzymdomäne. Die Aufnahme der Toxine erfolgt über die Bindung des C-Terminus an Rezeptoren der Wirtszelle und anschließender clathrin- und dynaminabhängiger Endozytose. Die Enzymdomäne wird dann über Autokatalyse ins Cytosol entlassen (Reineke *et al.*, 2007). Hier katalysiert sie die Glykosylierung der Rho-, Rac-, Ras-, Ral- und Cdc42-GTPasen. Diese Regulatoren des Aktinzytoskeletts werden dadurch in ihre inaktive Form überführt, sodass es zur Abrundung der Zellen bis hin zur Apoptose kommt. Dies wiederum führt zu einer Beeinträchtigung der tight junctions und einem Verlust der Barrierefunktion. Letztere wird noch durch einen weiteren Mechanismus geschwächt. Eine cytokinvermittelte Kaskade, die die Entzündungsreaktion der Enterozyten zur Folge hat, wird durch Toxin A in Gang gesetzt. Es resultiert eine erhöhte Permeabilität und letztendlich die für die CDI typische Diarrhoe (Borriello, 1998; Carter *et al.*, 2012; Pothoulakis & Lamont, 2001; Voth & Ballard, 2005). Bei nicht toxischen *C. difficile* Stämmen wurde eine 115 bp Sequenz anstatt des PaLoc nachgewiesen (Braun *et al.*, 1996).

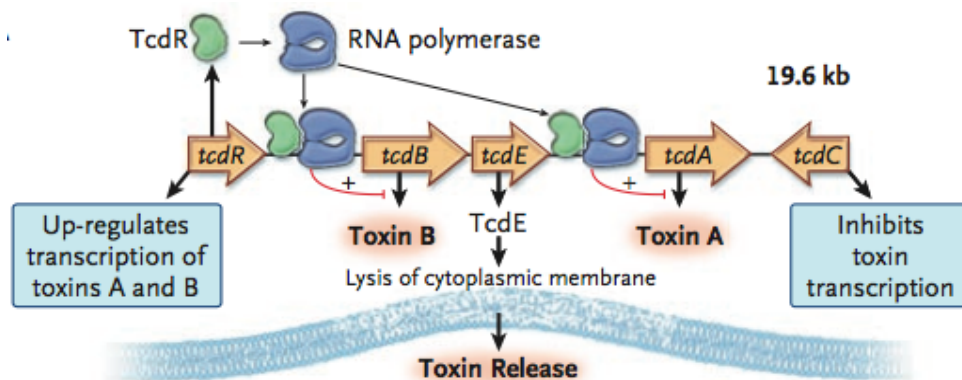


Abb. 2-3 *C. difficile* Pathogenitätslocus (Kelly & LaMont, 2008)

Zusätzlich wurden auf dem PaLoc drei offene Leserahmen gefunden. *TcdR* wirkt als indirekter positiver Regulator der Toxinsynthese, indem es für einen Sigmafaktor der RNA-Polymerase codiert und das Genprodukt somit die Transkription initiiert (Mani & Dupuy, 2001). Ein Gen für einen negativen Regulator (*tcdC*) findet sich den Toxingenen nachgeschaltet. Es wird in umgekehrter Richtung abgelesen und destabilisiert TcdR (Matamouros *et al.*, 2007). Die Bedeutung von TcdE besteht in seinen lytischen Eigenschaften. Es wird vermutet, dass es die Permeabilität der Bakterienzellwand erhöht und die Toxine dadurch leichter abgegeben werden können (Tan *et al.*, 2001).

### Cdt-Locus

Auf dem Cdt-Locus (CdtLoc) mit einer Größe von 4,2 bis 6,2 bp befinden sich drei Gene: die des binären Toxins, welches aus einer enzymatischen und einer bindenden Komponente, die von den Genen *cdtA* und *cdtB* kodiert werden, besteht und eines positiven Regulators *cdtR* (Barth *et al.*, 2004; Carter *et al.*, 2007; Perelle *et al.*, 1997). Die Prävalenz dieser Gene liegt zwischen 1,6 und 5,5 % (Rupnik *et al.*, 2003). Beide Genprodukte müssen bevor sie ihre eigentliche Funktion ausüben können, zunächst durch proteolytische Spaltung aktiviert werden (Perelle *et al.*, 1997). Nach Rezeptorbindung durch CdtB katalysiert die

Enzymdomäne CdtA intrazellulär die ADP-Ribosylierung von Aktinmonomeren und führt somit ebenso wie die Toxine A und B zur Auflösung des Zytoskeletts (Aktories & Wegner, 1992). Bei *C. difficile* Stämmen ohne genotypisch vorhandenem *cdtA/B* findet sich statt des CdtLoc eine 68 bp Sequenz mit noch unbekannter Bedeutung (Carter *et al.*, 2007).

### CDI in Deutschland

Die Epidemiologie von *C. difficile* hat sich v. a. im letzten Jahrzehnt stark gewandelt. Seit 2000 war zunächst ein signifikanter Anstieg der CDI Inzidenz und Mortalität in den USA zu verzeichnen (Dallal *et al.*, 2002; Muto *et al.*, 2005). Es folgten im Jahr 2002 Kanada, v. a. in der Region von Quebec, später auch europäische Länder wie Finnland, Grossbritannien, Belgien, die Niederlande, Frankreich, die Schweiz und Deutschland (Kuijper *et al.*, 2008; Pepin *et al.*, 2004; Valiquette *et al.*, 2004). In Deutschland haben die Inzidenzraten seit 2000 stetig zugenommen. Eine Studie aus Süddeutschland zeigte einen Anstieg um 5,8 % von 7,0 % 2000 bis 12,8 % 2007 (Borgmann *et al.*, 2008; Vonberg *et al.*, 2007). Damit ging auch eine erhöhte Frequenz an schweren, fulminanten und wiederkehrenden CDI einher (McFarland, 2008). Bei diesen schweren Verläufen zeigte sich häufig eine Assoziation mit bestimmten Ribotypen. 2008 stand innerhalb Deutschlands dabei Ribotyp 001 an erster Stelle. Er war mit einer Prävalenz von 70 % der deutschen Krankenhäuser der am weitesten verbreitete *C. difficile* Stamm und war in 47 % der Fälle Auslöser der CDI. Eine Dominanz dieses Ribotyps war auch in Regionen Niedersachsens 2009 und 2010 zu verzeichnen (Claußen *et al.*, 2011). Es folgten die Ribotypen 078 (Prävalenz 23 %, Inzidenz 8 %), 027 (Prävalenz 19 %, Inzidenz 8 %), 014 (Prävalenz 15 %, Inzidenz nicht angegeben) und 046 (Prävalenz 10 %, Inzidenz nicht angegeben). Für die hohe Prävalenz der Ribotypen 001 und 027 werden in erster Linie die vermehrt verwendeten Flourchinolone und die daraus resultierende Resistenzentwicklung verantwortlich gemacht. Aber auch andere Ribotypen weisen entsprechende Mutationen der Gyrasegene auf, sodass dies nicht die einzige Ursache zu sein scheint. Des Weiteren ist auffällig, dass Ribotyp 027 v. a. im Südwesten

Deutschlands vorkommt (Zaiss *et al.*, 2010). Studien anderer europäischer Länder zeigten ebenfalls das sog. „clustering“, eine erhöhte Prävalenz bestimmter Stämme in bestimmten Gegenden (Pituch *et al.*, 2007; Terhes *et al.*, 2006). Neben regionalen Faktoren spielt es auch eine Rolle, ob die CDI im Krankenhaus oder ambulant erworben wurde, welcher Ribotyp vorliegt. So wird z. B. Ribotyp 027 häufiger bei nosokomial erworbener CDI gefunden (Bignardi & Settle, 2008; Warny *et al.*, 2005).

Ribotyp 027 wurde erstmals in Deutschland im März 2007 bei einem 76-jährigen im Rahmen eines septischen Schocks verstorbenen Patienten retrospektiv isoliert (Zaiss *et al.*, 2007). Im Herbst desselben Jahres wurde erstmals die endemische Verbreitung dieses Ribotyps mit 31 % der typisierten Proben für die Gegend um Trier gezeigt (Jansen *et al.*, 2010). 2008 war er für 8 % der schwer verlaufenden CDI in Deutschland verantwortlich (Zaiss *et al.*, 2010). Im internationalen Vergleich ist dieser Wert momentan noch gering. In Grossbritannien lag er im gleichen Jahr bei 41 % und vier Jahre zuvor in Quebec bereits bei 80 %. In beiden Regionen verdrängte Ribotyp 027 den Ribotypen 001 von der führenden Position (Brazier *et al.*, 2008; Labbe *et al.*, 2008).

#### Neue epidemisch relevante Ribotypen am Beispiel von 027 und 078

Der PCR-Ribotyp 027 wurde erstmals unter der Bezeichnung CD196 im Jahr 1985 als nicht-epidemischer Stamm beschrieben (Popoff *et al.*, 1988). Auf Grund von Mikroevolution kam es in den letzten Jahren jedoch zu einer veränderten Pathogenität einhergehend mit erhöhter Virulenz (Stabler *et al.*, 2006).

Für diese hohe Virulenz sind mehrere Ursachen verantwortlich. Der neue Ribotyp 027 zeigt Punktmutationen der quinolone-resistance-determining region des DNA-Gyrasegens *gyrA*, wodurch eine Resistenz gegenüber Flouorchinolonen entstand (Drudy *et al.*, 2007). In der Diagnostik der vorliegenden Arbeit wurde diese mit erfasst. Weitere Antibiotikaresistenzgene liegen auf sog. konjugativen Transposons. Dies sind mobile genetische Elemente, die durch Konjugation in eine Wirts-DNA integriert werden können (Salyers *et al.*, 1994). Hierzu gehört z. B. das

Chloramphenicolresistenzgen des Transposons CTn-027 (Stabler *et al.*, 2009).

Des Weiteren wurde angenommen, dass der hochvirulente Stamm ein erhöhtes Sporulationsvermögen aufweist. Gezeigt wurde dies von Akerlund *et al.* 2008. Zwei Jahre später fand Burns *et al.* (2010a) jedoch eine verminderte und verlangsamte Sporulation bei Ribotyp 027, sodass die Rolle der Sporenbildung bei der Bestimmung der Virulenz noch nicht geklärt ist. Hierfür wird aktuell zunächst noch nach entsprechenden Genen und dem Mechanismus der Sporenkeimung von *C. difficile* geforscht (Burns *et al.*, 2010b). Unter Anderem sollen dabei Gallensalze und das spore cortex-lytic enzyme SleC eine wichtige Rolle spielen (Burns *et al.*, 2010a; Giel *et al.*, 2010; Sorg & Sonenshein, 2008, 2009).

Aber auch Veränderungen im PaLoc lassen sich bei dem modernen Ribotyp 027 finden. Zum Einen ist die Gensequenz der Bindungsdomäne von Toxin B mutiert, sodass es zu einer höheren Bindungsaffinität kommt, zum Anderen wurden Deletionen und Punktmutationen im Gen des Negativregulators TcdC nachgewiesen, die dessen Funktionsfähigkeit mindern bzw. durch Einbau eines Stoppcodons zu dessen Verlust führen und damit eine vermehrte Toxinsynthese bewirken (Deneve *et al.*, 2009; MacCannell *et al.*, 2006; Stabler *et al.*, 2006, 2009; Warny *et al.*, 2005). Auch der Nachweis dieser Mutation erfolgte PCR-gestützt für diese Arbeit.

Ribotyp 078 zeichnet sich ebenfalls durch eine erhöhte Virulenz aus. In Europa noch an elfter Stelle aller vorgefundenen Ribotypen, war er vor einigen Jahren bereits der vorherrschende Stamm bei der *C. difficile* induzierten Diarrhoe bei Schweinen und Kälbern (Barbut *et al.*, 2007; Keel *et al.*, 2007). Bis 2008 stieg die Prävalenz stark an, sodass er 2008 bereits der zweithäufigste Ribotyp in deutschen Krankenhäusern war (Zaiss *et al.*, 2010). Im Vergleich zu Ribotyp 027 betrifft 078 häufiger Patienten unter 65 Jahren, auch das Verhältnis ambulant zu nosokomial erworbener CDI ist bei diesem Ribotyp höher. Der Anteil an schweren Verläufen sowie der Mortalität ist jedoch bei beiden Stämmen gleich. Gemeinsamkeiten lassen sich ebenfalls bezüglich der Virulenzfaktoren finden.



Ribotyp 078 besitzt Gene für Toxin A und B sowie für das binäre Toxin. Eine Mutation, die zum Einbau eines Stoppcodons in *tcdC* führte, konnte nachgewiesen werden. In ihrer Resistenzlage unterscheiden sich die beiden Stämme jedoch. 078 erwies sich als sensibel gegenüber Moxifloxacin. Resistenzen zeigten sich gegenüber Clindamycin und Erythromycin (Goorhuis *et al.*, 2008). Hierfür ist u. a. das *erm(B)* Gen verantwortlich, welches auf einem konjugativen Transposon (Tn5398) lokalisiert ist (Spigaglia *et al.*, 2004).

## 2.3 Diagnostische Methoden

Neben der klinischen Symptomatik ist für die Diagnosestellung einer CDI der Nachweis von Clostridien bzw. deren Toxine aus Stuhl ausschlaggebend. Die Methoden hierzu sind vielfältig, sie unterscheiden sich in Dauer, Aufwand, Kosten sowie der Zielstruktur, die nachgewiesen werden soll. Gegebenenfalls, z. B. bei Ileuspatienten, kann auch ein endoskopischer oder histopathologischer Nachweis einer pseudomembranösen Kolitis zur Diagnosestellung herangezogen werden (Bauer *et al.*, 2009; Cohen *et al.*, 2010). Außerdem kann zur weiteren Unterscheidung von *C. difficile* eine Ribo- und Toxinotypisierung vorgenommen werden. Letztendlich wird in dieser Arbeit gezeigt, dass die Kombination mehrerer diagnostischer Methoden notwendig ist, um eine eindeutige Diagnose stellen zu können.

### Enzymimmunoassay (EIA)

EIAs werden zur quantitativen Bestimmung biologischer Substanzen genutzt, indem enzymmarkierte Antikörper, z. B. Meerrettichperoxidase, an entsprechende Antigene binden und durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht werden. Bei der *C. difficile* Diagnostik dienen EIAs als zeitsparende Schnelltests zum Nachweis von Toxin A, B und des Enzyms Glutamatdehydrogenase (GLDH), entweder als selektive oder kombinierte Tests. GLDH allein ist als Zellwandantigen jedoch unspezifisch, da hierdurch keine Differenzierung zwischen toxischen und nicht toxischen *C. difficile* Stämmen möglich ist, und es zudem in

nah verwandten Clostridienspezies vorkommt. Ein kombinierter Test ist nicht nur aus diesem Grund sinnvoll, sondern auch weil in 2 bis 5 % der Fälle lediglich Toxin B synthetisiert wird (Crobach *et al.*, 2009; Cohen *et al.*, 2010; Kufelnicka & Kirn, 2011).

### Nukleinsäureamplifikation

Die Nukleinsäureamplifikation dient dem Nachweis von *C. difficile* Genen, insbesondere der Toxingene und Basenpaardeletionen, durch Polymerase-Ketten-Reaktion. Durch die Wiederholung mehrerer Zyklen aus Denaturierung, Bindung von Oligonucleotiden und Bildung neuer Doppelstränge kommt es zu einer exponentiellen Zunahme spezifischer amplifizierter DNA-Moleküle. Ein neuer Ansatz ist die Multiplex-PCR. Mehrere Studiengruppen entwickelten hierfür in den letzten Jahren verschiedene Assays (Barbut *et al.*, 2011; Hoegh *et al.*, 2011; Persson *et al.*, 2011). Im Gegensatz zur Uniplex-PCR, mit der nur ein Gen nachgewiesen wird, zeichnet sie sich durch höhere Effizienz aus. Es können gleichzeitig mehrere DNA-Sequenzen durch Primer mit mehreren unterschiedlich markierten Sonden amplifiziert werden. Es handelt sich hierbei also nicht nur um ein zeit- sondern auch materialsparendes Verfahren (Edwards & Gibbs, 1994).

### Anaerobe Kultur

*C. difficile* kann direkt aus Stuhlproben kultiviert werden. Hierfür eignen sich spezielle Medien, wie Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Agar, die für mindestens 48 Stunden anaerob bebrütet werden müssen. Mit Hilfe einer Vorbehandlung der Proben durch Alkoholschock oder des Zusatzes von Taurocholsäure oder Lysozym kann die Erfolgsrate bei der Anzucht gesteigert werden (Borriello & Honour, 1981; Wilcox *et al.*, 2000). *C. difficile* wächst je nach Agar in bis zu 7,5 mm großen, leicht gewölbten, gelblichen, matt glänzenden Kolonien mit rhizoidem Rand ohne Hämolyse. Des Weiteren wird es durch den pferdestallartigen Geruch auf Grund von p-Kresol-Synthese charakterisiert. Unter Wood-Licht fluoreszieren die Kolonien in gelber bis hellgrüner Farbe (Delmee, 2001;

George *et al.*, 1979). Nachteil dieser Methode ist die fehlende Unterscheidung zwischen toxischen und nicht toxischen *C. difficile* Stämmen, sodass im Anschluss noch weitere Untersuchungen nötig sind. Durch diese Faktoren wird die Dauer bis zur endgültigen Diagnose einer CDI negativ beeinflusst. Die Kultur ist jedoch für die Antibiotika-Sensibilitätstestung unverzichtbar, ebenso wie für die Isolatherstellung zur genaueren Differenzierung der *C. difficile* Stämme (Kufelnicka & Kirn, 2011; Crobach *et al.*, 2009).

#### Cell cytotoxicity assay (CCA)

Dieser Test beruht auf dem Nachweis, des durch Toxine hervorgerufenen zytopathischen Effekts in Zellkultur und der Reversibilität durch spezifisches Antiserum. Auf eine Zellschicht, z. B. von Vero-, CHO-, HeLA-, Hep-2-Zellen oder human foreskin Fibroblasten, wird eine aufbereitete Stuhlprobe gegeben. Auf Grund der Zytotoxizität kommt es zur Rundzellenbildung der inokulierten Zellen nach 24 bis 48 Stunden. Der Effekt kann anschließend durch *C. sordelli*- oder *C. difficile* Antitoxin neutralisiert werden. Wie auch die Kultur ist der CCA relativ zeitaufwendig (Crobach *et al.*, 2009; Delmee, 2001; Kufelnicka & Kirn, 2011).

#### Molekulare Typisierungsverfahren für *Clostridium difficile*

*C. difficile* kann anhand von unterschiedlichen Merkmalen durch eine Vielzahl an Typisierungsverfahren in Erregerstämme eingeteilt werden. Vor über 20 Jahren bereits wurde das Immunoblotting oder die Einteilung von *C. difficile* in Sero-  
gruppen mittels Agglutinationsverfahren durchgeführt (Delmee, 1985; Heard *et al.*, 1986).

Eine weitere Möglichkeit der Einteilung ist das Toxinotyping. Es differenziert 24 Toxinotypen (I – XXIV) und den Referenz-Toxinotyp 0. Sie unterscheiden sich in ihrer PaLoc-Region auf Grund von Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen. Nach einer RFLP-PCR werden die amplifizierten Fragmente in Länge und Restriktionsschnittstellenpolymorphismen miteinander verglichen und so einem Toxinotyp zugeordnet (Rupnik, 2008).

Bei der Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis (MLVA) werden sieben kurze Wiederholungssequenzen, welche über das gesamte Genom verteilt sind, amplifiziert und sequenziert. Anhand der Kopiezahlen werden die Isolate dann den Stämmen zugeordnet (van den Berg *et al.*, 2007).

Weitere Typisierungsverfahren sind z. B. amplified fragment length polymorphism (AFLP), eine Kombination aus Enzymrestriktion und PCR, oder multilocus sequence typing (MLST) und surface layer protein A gene sequence typing (slpAST), die beide auf der Sequenzierung spezifischer Gensegmente (Haushaltsgene bzw. Oberflächenprotein A) basieren. Das *slpA* Gen kodiert für ein Vorläuferprotein der surface layer Proteine P36 und P47 (Karjalainen *et al.*, 2001; Killgore *et al.*, 2008).

Für die Beschreibung des hochvirulenten Stammes B1/NAP1/027 kommen in entsprechender Reihenfolge restriction endonuclease analysis (REA), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) und PCR-Ribotyping zum Einsatz. Erstere beruhen auf Enzymrestriktion der gesamten genomischen DNA. Bei der REA wird sie mit der Restriktionsendonuklease *HindIII* und bei der PFGE mit *SmaI* gespalten und nach ihrem Bandenmuster eingeteilt. Die Gruppen der REA werden mit Buchstaben, die Untergruppen mit arabischen Ziffern bezeichnet. Die PFGE unterscheidet nummerierte NAP-Typen (North American pulsed-field type) (Clabots *et al.*, 1993; Killgore *et al.*, 2008). Die Ribotypisierung basiert auf PCR-Produkten der 16S bis 23S rRNA IGS-(intergenic spacer) Region. Dabei werden Längen von 233 bis 680 bp beschrieben. Inzwischen werden über 150 verschiedene Ribotypen unterschieden, die in ihrer Nomenklatur jedoch nicht einheitlich sind, da keine internationale Stammsammlung vorliegt (Indra *et al.*, 2008).

## 2.4 Zielsetzung

Infektionen mit *Clostridium difficile* gewannen in den letzten Jahrzehnten zunehmend an Relevanz auf Grund der weltweiten Zunahme der CDI Fälle und dem Aufkommen neuer hypervirulenter Stämme (McDonald *et al.*, 2006; Vonberg *et al.*, 2007). Die vorliegende Arbeit setzt sich aus zwei Teilen zusammen. Die retrospektive Auswertung der am UKS erfassten Daten von 2000 bis 2010 befasst sich mit den jährlichen Fallzahlen der CDI im Saarland und Patientencharakteristika (Alter, Geschlecht) im Verlauf der Jahre. Des Weiteren wurden die Besonderheiten in Bezug auf die einsendenden Fachrichtungen ausgewertet. Hierbei sollten die Epidemiologie im Saarland sowie Zusammenhänge der genannten Faktoren mit einer CDI aufgedeckt und mit der internationalen Datenlage verglichen werden.

Prospektiv wurden 101 Stuhlproben mit diskrepantem Antigennachweis für GLDH und Toxin A/B am mikrobiologischen Institut des UKS untersucht. Für jede Probe erfolgte neben der Routinelabordiagnostik (Antigennachweis, Kultur, *slpA*-Sequenztypisierung) die weitere Untersuchung mittels Multiplex-PCR. Ziel dieser prospektiven Arbeit war es, diskrepante Befunde aufzuzeigen, zu evaluieren und anhand experimenteller Grundlagen für die zukünftige Diagnostik Algorithmen zu etablieren, die sich durch hohe Zuverlässigkeit, geringen Zeitaufwand und Kosteneffektivität auszeichnen.

### **3 Material und Methoden**

Die Arbeit gliedert sich in einen retrospektiven Teil zur Untersuchung der am UKS erhobenen *C. difficile* Befunde von 2000 bis 2010 und einen prospektiven Teil zur vergleichenden Untersuchung verschiedener Möglichkeiten eine *C. difficile* Infektion zu diagnostizieren.

#### **3.1 Retrospektive Auswertung**

Die Datenabfrage der Ergebnisse für *C. difficile* am UKS für die Jahre 2000 bis 2010 erfolgte bis 2006 über das hausinterne MIB-Programm, im Anschluss über die M/Lab-Software. Die Datenbanken wurden retrospektiv nach folgenden Suchkriterien analysiert: Anzahl der *C. difficile* Anforderungen, Ergebnis des Toxintests, Alter und Geschlecht der Patienten, Monat der Stuhlprobenabgabe sowie einsendende Klinik.

Die statistische Auswertung erfolgte für parametrische Daten mittels Fisher's exact test, für nicht parametrische quantitative Daten mit dem Kruskal Wallis Test. Wenn nicht anders gekennzeichnet, wurden im Text Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung in Klammern angegeben.

#### **3.2 Prospektive Auswertung**

Als Ausgangsmaterial dienten frische Stuhlproben von Patienten mit Verdacht auf eine *Clostridium difficile* Infektion, die von den einzelnen Kliniken des UKS bzw. von externen saarländischen Krankenhäusern oder Ärzten eingesandt wurden. Diese wurden zunächst mittels Glutamatdehydrogenase- und Toxin A/B – EIA getestet. GLDH-positive und Toxin-negative Proben wurden im Zeitintervall von März bis August 2011 in die Studie eingeschlossen.

Im Rahmen der Routinediagnostik erfolgte die anaerobe Anzucht aus nativen Stuhlproben der Patienten mit Verdacht auf eine CDI und die anschließende massenspektrometrische Untersuchung. Des Weiteren wurde ein GLDH- und Toxinantigennachweis durchgeführt. Es wurden jeweils entsprechende Isolate angelegt. Diese dienten einer erneuten Anzucht von *C. difficile* Kolonien um daraus Toxinantigen nachzuweisen.

### **3.2.1 Antigennachweise**

Der qualitative Nachweis von *Clostridium difficile* spezifischen Antigenen erfolgte zum Einen aus Nativstuhlproben und zum Anderen aus Isolaten mit einem kombinierten Membranenzymimmunoassay-Schnelltest für Glutamatdehydrogenase sowie für die Toxine A und B.

Der Schnelltest (C. diff Quik Chek Complete, Techlab) wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und mit Hilfe der beiliegenden Testkarte im Anschluss an die zehnminütige Reaktionszeit ebenfalls nach Herstellerangaben ausgewertet. Bei GLDH-positivem und Toxin-negativem Ergebnis erfolgte die weitere Untersuchung der Proben im Rahmen der Studie im hauseigenen PCR-Labor.

### **3.2.2 Anaerobe Kultur**

Für die anaerobe Anzucht von *Clostridium difficile* wurde mit einer sterilen Impföse 1 ml der nativen Stuhlprobe entnommen. Mittels Drei-Ösen-Ausstrich wurde diese auf CLO-Agar, ein Selektivnährboden für *Clostridium difficile*, gegeben und in den GENbox-Anaerobiertopf (Biomérieux) nach Herstellerangaben eingebracht. Die anaerobe Bebrütung der beimpften Petrischalen erfolgte bei 37 °C für 48 Stunden. Anschließend wurden die angezüchteten Kulturen nach Morphologie und Geruch beurteilt. *C. difficile* zeigte sich als grau-weiße Kolonie mit faserigem Rand ohne Zeichen der Hämolyse sowie durch den pferdestallartigen Geruch (Abb. 3-1).



**Abb. 3-1**      ***C. difficile* Kultur auf CLO-Agar**

Zur Bestätigung eines *C. difficile* positiven Ergebnisses wurden die Proben massenspektrometrisch mit MALDI-TOF (MALDI-Biotyper, Bruker) untersucht. Diese Untersuchung stellt eine Kombination aus Matrix-unterstützter Laser-Ionisation und Flugzeitmassenspektrometer dar. Auf diese Weise wurde mit allen eingegangenen Stuhlproben mit Verdacht auf eine CDI verfahren. Die Weiterkultivierung der Isolate erfolgte auf anaerob bebrüteten Columbia Agar Platten.

### **3.2.3 Surfacylayer-ProteinA-Sequenztypisierung**

Die genotypische Charakterisierung der Isolate erfolgte wie bereits beschrieben durch Sequenzierung des Surfacylayer-Protein A Gens (Kato *et al.*, 2001). Nach DNA-Isolierung aus Kulturen und PCR des spezifischen Genabschnitts wurde das PCR-Produkt mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht, anschließend erfolgte die Sequenzierung und der Abgleich mit Datenbanken sowie eine Ergebnis-Validierung.

### **3.2.4 Multiplex-PCR für *Clostridium difficile***

Im Rahmen der Studie für diese Arbeit wurden die Stuhlproben, die in der Routinediagnostik ein GLDH-positives und Toxin-negatives Ergebnis aufwiesen, einer PCR-Untersuchung unterzogen.



### DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung aus den Stuhlproben erfolgte mit dem Maxwell 16 MDx Instrument (Promega) und dem Maxwell 16 Tissue LEV Total RNA Purification Kit (Promega). Mit einer sterilen 1 µl Impföse wurde eine etwa 2 mm<sup>3</sup> große Menge an Probematerial in die entsprechende Lysepuffer enthaltende Vertiefung der jeweiligen Kartusche eingebracht. Anschließend wurde das Gerät weiter nach Herstellerangaben vorbereitet und das bereits vom Hersteller vorprogrammierte Programm „Gesamte virale Nukleinsäure“ durchlaufen.

Die einzelnen Schritte des Programms bestehen aus Lyse der in der Probe enthaltenen Mikroorganismen, der DNA-Bindung an paramagnetische Partikel, Trocknungsschritten und der Eluierung der Zielmoleküle.

Zur Aufbewahrung wurden die Eluierungsröhrchen mit der isolierten DNA-Lösung bei -20 °C gelagert.

### PCR-Amplifikation

Die verwendete Multiplex-PCR diente der Amplifikation folgender *C. difficile* Gene in einem gemeinsamen Reaktionsansatz: Toxingene A und B (*tcdA*, *tcdB*), binäre Toxingene (*cdtA*, *cdtB*), Regulorgendeletionen (*tcdC*), Moxifloxacinresistenzgene (*gyrA*).

Durch die Wiederholung mehrerer Zyklen aus Denaturierung, Bindung von Oligonucleotiden und Bildung neuer Doppelstränge kommt es zu einer exponentiellen Zunahme amplifizierter DNA-Moleküle. Ein Vorteil der Multiplex-PCR, im Gegensatz zur Uniplex-PCR, stellt die höhere Effizienz dar. Es können gleichzeitig mehrere DNA-Sequenzen durch Primer mit mehreren unterschiedlich markierten Sonden amplifiziert werden. Es handelt sich hierbei also um ein zeit- und materialsparendes Verfahren (Edwards & Gibbs, 1994).

Der Amplifikationsansatz wurde auf Eis in einem Reinraum hergestellt. Hierfür wurden pro Ansatz 35 µl Primer-Nukleotid-Mix, 5 µl 10x-Puffer, 2 µl MgCl<sub>2</sub>, 3 µl Aqua destillata sowie 0,3 µl Taq-Polymerase in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß

pipettiert, und anschließend zu je 45 µl in Multiply-µStrip-Gefäße (Sarstedt) aliquotiert. In einem separaten Bereich wurden nun 5 µl der DNA-Lösung der jeweiligen Probe dazu pipettiert und durchmischt. Pro Ansatz wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, die mit destilliertem Wasser zu einem Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt wurde. Anschließend wurden die Proben mit dem Galaxy Mini Star (VWR) zentrifugiert.

Für die Amplifikation im Thermocycler (GTQ-Cycler 24, Hain Lifescience) diente folgendes Protokoll (Tab. 3-1):

**Tab. 3-1 Thermocyclerprotokoll für PCR-Amplifikate**

1.	5 min	95 °C	1 Zyklus
2.	30 sec	95 °C	10 Zyklen
	2 min	58 °C	
3.	25 sec	95 °C	30 Zyklen
	40 sec	53 °C	
	40 sec	70 °C	
4.	8 min	70 °C	1 Zyklus

Die Lagerung erfolgte bei einer Temperatur zwischen -20 und 8 °C.

### Hybridisierung

Die reverse Hybridisierung zur Detektion der positiven Signale erfolgte automatisiert mit dem ProfiBlot II T (Tecan). Generell besteht Schritt eins aus der Denaturierung der Amplifikationsprodukte, Schritt zwei aus der Hybridisierung der Biotin-markierten einzelsträngigen Amplifikate an membrangebundene Sonden. Im dritten Schritt werden alle unspezifisch gebundenen Amplifikate entfernt und letztendlich ein Streptavidin/Alkalische Phosphatase(AP)-Komplex hinzugegeben, der zu einer AP-vermittelten Farbreaktion führte.

Es wurden für jede zu untersuchende Probe 20 µl Denaturierungsreagenz in eine Inkubationswanne pipettiert und anschließend dieselbe Menge der Probe hinzugegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Bei Raumtemperatur wurde das Denaturierungsreagenz-Amplifikat-Gemisch für 5 Minuten inkubiert. Die Lösungen für Konjugat und Substrat wurden vorbereitet, indem das jeweilige Konzentrat mit dem entsprechenden Puffer in einem Verhältnis von 1:100 verdünnt wurde. Anschließend wurde die Wanne in den zuvor nach Herstellerangaben vorbereiteten ProfiBlot II T (Tecan) eingelegt und folgendes Programm gestartet:

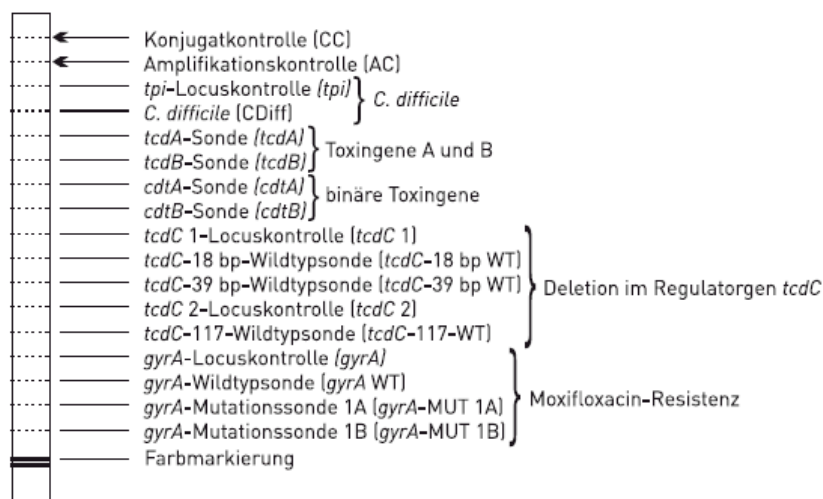
- Hybridisierung
  - Inkubation mit 1 ml vorgewärmter Hybridisierungslösung für 2 Minuten bei 45 °C
  - Pause zum Einlegen der mit Gelstift nummerierten Membranstreifen
  - Weitere Inkubation für 30 Minuten bei 45 °C
  - Absaugen der Lösung
- Entfernung der unspezifisch gebundenen Amplifikate
  - Inkubation mit 1 ml vorgewärmter Stringent-Waschlösung für 15 Minuten bei 45 °C
  - Absaugen der Lösung
- Konjugation mit Streptavidin/Alkalische Phosphatase-Komplex
  - Inkubation mit 1 ml Konjugat (1:100 verdünnt) für 30 Minuten bei Raumtemperatur
  - Absaugen der Lösung
- Waschen der Membranstreifen (je 2x)
  - Inkubation mit 1 ml Rinse-Lösung für 2 Minuten bei Raumtemperatur
  - Absaugen der Lösung
- Waschen der Membranstreifen
  - Waschen mit 1 ml Aqua destillata für 2 Minuten bei Raumtemperatur
  - Absaugen der Lösung

- Alkalische Phosphatase-vermittelte Farbreaktion
  - Inkubation mit 1 ml Substrat (1:100 verdünnt) für 6 Minuten bei Raumtemperatur
  - Absaugen der Lösung
- Waschen der Membranstreifen (je 2x)
  - Waschen mit 1 ml Aqua destillata für 2 Minuten bei Raumtemperatur
  - Absaugen der Lösung

Nach Beendigung des Programms wurden die Streifen aus ihrer jeweiligen Kavität entnommen, wenige Minuten an Raumlufte getrocknet und auf dem zugehörigen Protokollbogen mit transparentem Klebestreifen befestigt.

### Auswertung der Ergebnisse

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer Schablone der Firma Hain Lifescience (Abb. 3-2):

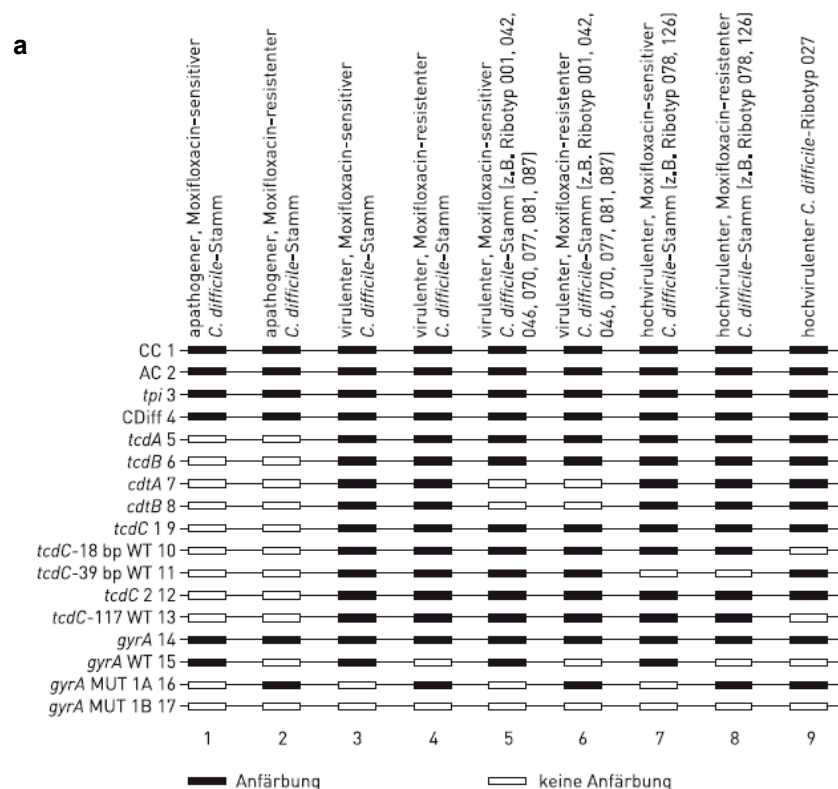


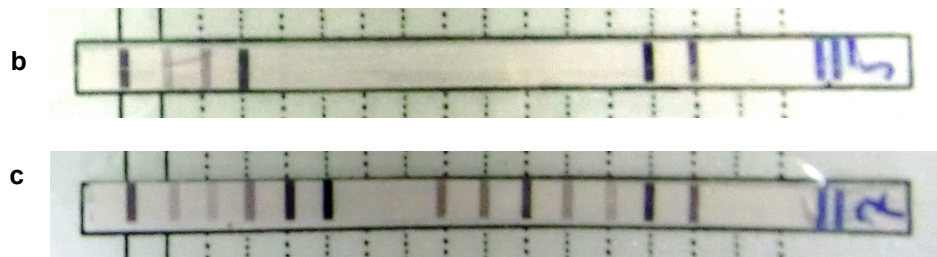
**Abb. 3-2 Schablone zur Auswertung des Membranstreifenbandenmusters (Hain Lifescience)**

War das Amplifikat *Clostridium difficile* negativ, erschienen lediglich die Konjugat(CC)- und die Amplifikationskontrolle (AC). Bei positivem Ergebnis

wurden zudem die *tpi*-Locuskontrolle und die *C. difficile* Bande (CDiff) sichtbar. Je nach Anfärbung des Membranstreifens wurden die Proben in zehn verschiedene Gruppen aufgeteilt, wobei Gruppe eins bis neun auf Abb. 3-3a zu sehen sind. Proben der Gruppe eins (Abb. 3-3b) und zwei waren ohne Toxingennachweis, die der Gruppe fünf (Abb. 3-3c) und sechs zeigten nur die Gene für Toxin A (*tcdA*) und B (*tcdB*), alle übrigen für Toxin A, B und das binäre Toxin (*cdtA/cdtB*). Gruppe zehn bezeichnete alle Bandenmuster, die nicht in Gruppe eins bis neun fielen, aber *Clostridium difficile* positiv waren. Die weiteren Banden gaben Hinweise auf Deletionen im *tcdC*-Regulatorgen sowie auf eine mögliche Moxifloxacinresistenz. Somit war z. B. auch der Nachweis des hochvirulenten Ribotyps 027 möglich.

Die Ergebnisse wurden in einen Protokollbogen übertragen, der neben o. g. Informationen auch das Geschlecht und das Alter des Patienten, sowie die Ergebnisse der Stuhlkultur, des Toxinantigennachweises aus den Isolaten und die Ribotypisierung enthielt.





**Abb. 3-3** a) Auswertung des Membranstreifenbandenmusters (Hain Lifescience)  
b) und c) Beispiele von Original-Membranstreifen (vergrößert)

#### Anzucht von *Clostridium difficile* Kulturen

Von allen untersuchten Proben wurden im Rahmen der Laborroutine Isolate angelegt. Es erfolgte ein Vergleich der PCR-Ergebnisse aus einer Anzahl von 27 Isolaten mit den entsprechenden Befunden aus nativem Stuhl um eventuelle Diskrepanzen zu detektieren. Hierzu wurde aus den Isolaten *C. difficile* auf Columbia-Agar in einem Anaerobiertopf (Merck) mit zuvor eingebrachtem Katalysator (Oxoid) angezüchtet. Das Gefäß wurde im Jar Gassing System (Don Whitley Scientific) dem anaeroben Zyklus unterzogen und nachfolgend bei 37 °C anaerob im Brutschrank (Typ B 6200, Heraeus) inkubiert. Nach 72 Stunden erfolgte die Isolierung der Bakterien-DNA, die PCR-Amplifikation, die Hybridisierung sowie die Ergebnisauswertung nach oben beschriebenem Schema. Einzige Unterschiede zu den Nativstuhlproben stellten die Menge der für die Amplifikation benötigten Menge an Taq-Polymerase (0,2 anstatt 0,3 µl) und das Thermocyclerprotokoll (Schritt 3: 20 anstatt 30 Zyklen) dar. Diese Ergebnisse wurden bezüglich *C. difficile* Positivität, Toxinnachweis und Mutationen im *tcdC*- sowie *gyrA*-Gen mit den Befunden ihrer korrespondierenden Nativstuhlprobe verglichen.

### 3.3 Geräte, Reagenzien und Software

#### Kultur

COS (Columbia agar + 5% sheep blood)	Biomérieux
Anaerobiertopf 2,5 l-Volumen mit Deckel	Merck
Plattenkorb für 12 Petrischalen	Merck
Anaerobier-Sicherheitskatalysator	Oxoid
Macs mics jar gassing system	Don Whitley Scientific
CLO (Selektivmedium zur Anzucht von <i>Clostridium difficile</i> aus Stuhlproben)	Biomérieux
GENbox Anaerobiertopf 7,0 l	Biomérieux
GENbox anaer (10 Aluminiumbeutel mit je 1 Gasgenerator)	Biomérieux
Brutschrank Typ B 6200	Heraeus

#### Massenspektrometrie

MALDI Biotyper mit MALDI Biotyper Automation Control Software	Bruker
HPLC geeignetes Wasser	Fluka
Formic-Acid	Fluka
Trifluoressigsäure	Sigma Aldrich
Acetonitrile	Fluka
Ethanol absolut	Fluka
Ethanol 70 %	zentrales Chemi- kalienlager UdS
Trifluoressigsäure 80 %	zentrales Chemi- kalienlager UdS

HCCA portioned	Bruker
BTS (Bakterien-Test-Standard)	Bruker

### Antigennachweis

C. diff Quik Chek Complete	Techlab
----------------------------	---------

Inhalt:	Testkarte
	Verdünnungspuffer
	Waschpuffer
	Substrat
	Konjugat
	Positivkontrolle
	Einweg-Kunststoffpipette

Reagenzgläser	Eppendorf
---------------	-----------

Applikatorstäbchen

Lab Dancer S40	Vortexer	VWR
----------------	----------	-----

### Surface-Layer-Protein A Sequenzierung

Primer slpAcom 19 (Nr. 76)	Biomers
----------------------------	---------

(GTT GGG AGG AAT TTA AGR AAT G)

Primer slpAcom 22 (Nr. 77)	Biomers
----------------------------	---------

(GCW GTY TCT ATT CTA TCD TYW CC)

Taq DNA Polymerase Kit Cat. No. 201207	Qiagen
--	--------

Inhalt:	10x PCR-Puffer
	Q-Lösung
	Taq-Polymerase



PCR grade Aqua destillata	Braun Melsungen AG	
dNTP-Set	Roth	
Multiply-µStrip Pro 8er Kette	0,2 ml PCR-Gefäße	Sarstedt
UNOII-Thermoblock	Thermocycler	Biometra
TBE Puffer (1:10) (Tris-Borat-EDTA Puffer)	Merck	
QA-Agarose TM Cat. No. AGAH0500	MP North American	
Laufpuffer (1:10 TBE Puffer)	Merck	
Gelelektrophoresekammer SubCell QT	BioRad	
Transilluminator	Ultra-Violet Products	
ExoSAP – IT	USB	
Safelock Tubes, 1,5 ml	Eppendorf	
Mikrowelle	Elektrolux	
FinchTV Software	Geospiza	
NCBI BLAST Datenbank (Basic Local Alignment Search Tool)		
<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>		

#### Stuhl-/Kulturaufreinigung

Maxwell 16 MDx Instrument	Promega
Maxwell 16 Tissue LEV Total RNA Purification Kit	Promega
Inhalt:	Maxwell 16 LEV RNA Cartridges
	Nuclease free water
	Elution tubes 0,5ml
	LEV Plungers

### Polymerase-Ketten-Reaktion

Galaxy Mini Star	Zentrifuge	VWR
Multiply-µStrip Pro 8er Kette	0,2 ml PCR-Gefäße	Sarstedt
GTQ-Cycler 24	Thermocycler	Hain Lifescience
Taq Polymerase Qiagen (50/U)		Hain Lifescience
Inhalt:	Taq Qiagen 5U/µl	
	MgCl <sub>2</sub> 25mM	
	10x Puffer (15mM MgCl <sub>2</sub> )	
	H <sub>2</sub> O dest.	

PNM (Primer-Nukleotid-Mix, GenoType CDiff Ver 1.0 Kit) Hain Lifescience

### Hybridisierung

ProfiBlot II T	automatischer Hybridisierungsblotprozessor	Tecan
GenoType CDiff Ver 1.0 Kit		Hain Lifescience
Inhalt:	Membranstreifen	
	Denaturierungsreagenz	
	Hybridisierungspuffer	
	Stringent-Waschlösung	
	Rinse-Lösung	
	Konjugat-Konzentrat	
	Konjugat-Puffer	
	Substrat-Konzentrat	
	Substrat-Puffer	

Aqua destillata

Retrospektive Auswertung

Hausinternes MIB-Programm

[M/Lab] Software	Dorner Health Solutions
------------------	----------------------------

Access 2003	Microsoft
-------------	-----------

Excel 2007	Microsoft
------------	-----------

Auswertung der Laborergebnisse

Protokollbogen (enthalten in GenoType CDiff Ver 1.0 Kit)	Hain Lifescience
--	------------------

Schablone (enthalten in GenoType CDiff Ver 1.0 Kit)	Hain Lifescience
---	------------------

[M/Lab] Software	Dorner Health Solutions
------------------	----------------------------

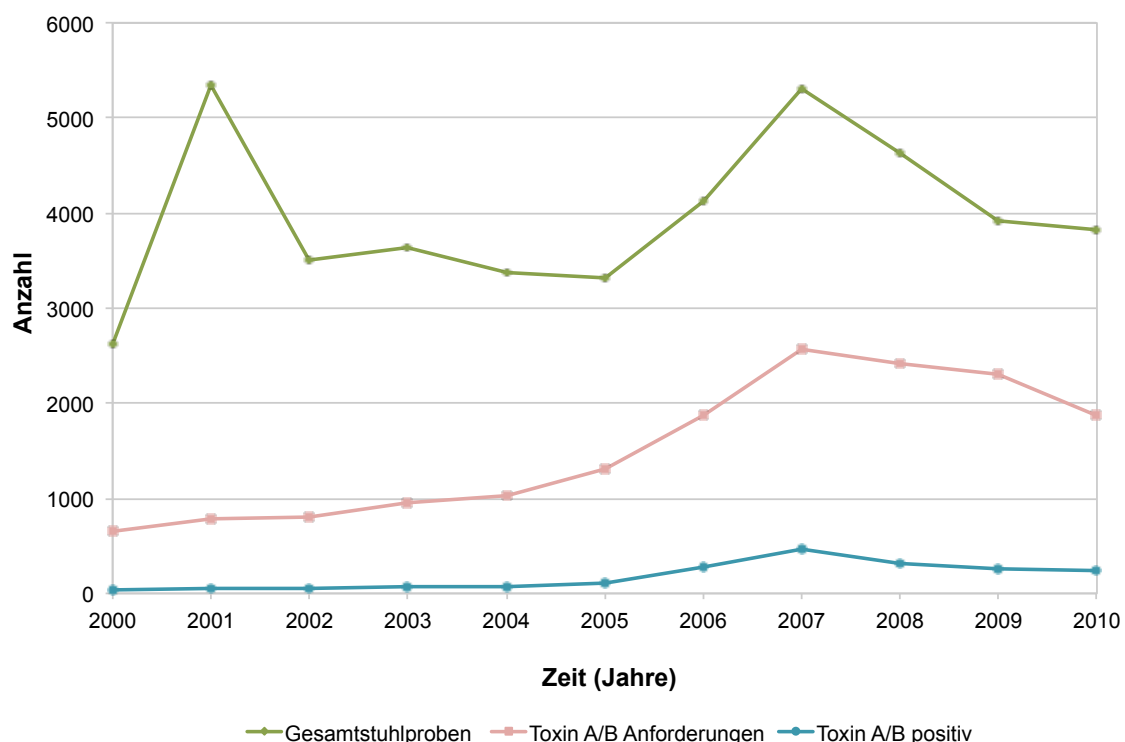
## 4 Ergebnisse

### 4.1 *Clostridium difficile* Infektionen am UKS 2000 – 2010

Die Auswertung der diagnostischen Proben von Januar 2000 bis Dezember 2010 bildete die Grundlage des retrospektiven Teils dieser Arbeit. Hierzu wurden die Toxin-Ergebnisse genauer ausgewertet. Die Häufigkeiten an *Clostridium difficile* Anforderungen und Toxin-positiven Proben der einzelnen Jahre, mit Aufgliederung in Geschlecht und Altersklassen, der verschiedenen einsendenden Kliniken sowie die Fluktuationen über die Monate eines Jahres wurden zueinander in Bezug gesetzt. Im Zeitraum vom 25.02.2010 bis 16.06.2010 fehlten eine Anzahl von insgesamt 465 Toxin-Ergebnissen. Grund war die Einführung des Glutamat-dehydrogenase-EIA, sodass erst ab Mitte Juni 2010 beide Tests kontinuierlich parallel durchgeführt wurden und später durch einen kombinierten EIA ersetzt wurden.

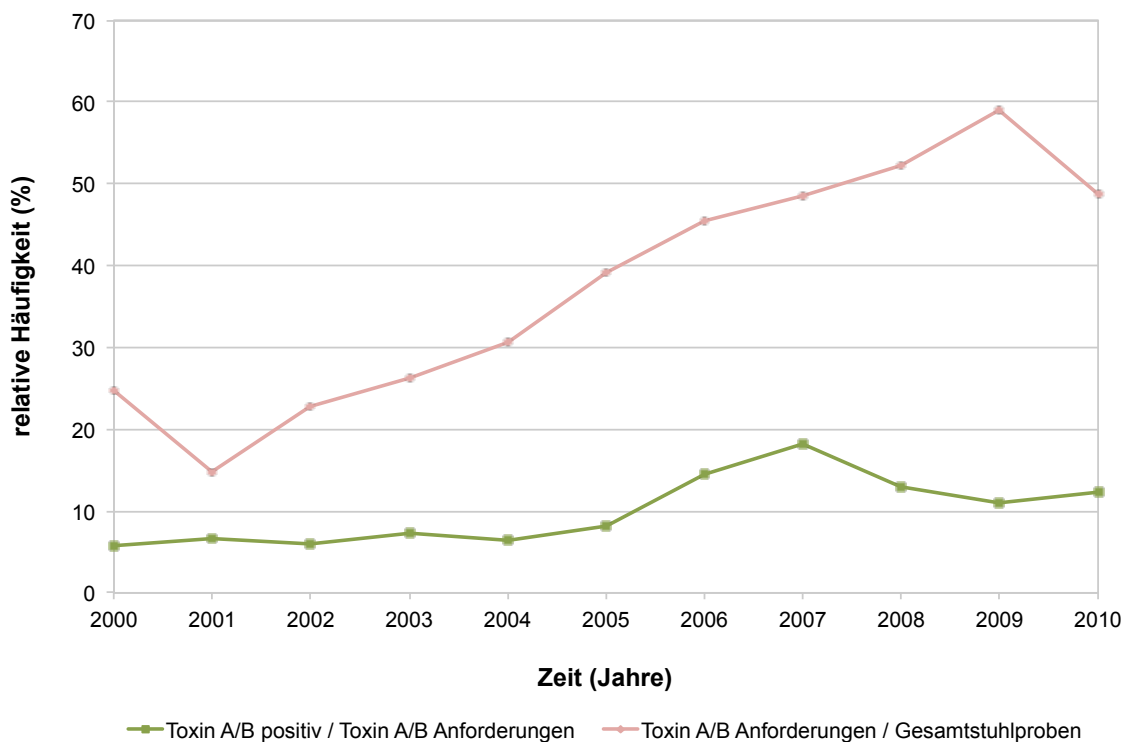
#### 4.1.1 *Clostridium difficile* Anforderungen und Befunde

Während des Untersuchungszeitraums von elf Jahren wurden jährlich zwischen 2618 und 5301 ( $3963 \pm 841$ ) diagnostische Stuhlproben untersucht (Abb. 4-1a). Bei einer etwa gleichbleibenden Anzahl an Gesamtstuhlproben stieg jedoch im gleichen Zeitraum die Zahl der *C. difficile* Anfragen von 648 (2000) auf ein Maximum von 2568 (2007) und fiel bis 2010 wieder auf 1870 ab ( $1507 \pm 721$ ). Die Zahl der positiven Toxinbefunde verhielt sich in dieser Zeit ähnlich, mit einem Anstieg von 37 (2000) auf 466 Positivproben (2007) und anschließendem Abfall auf etwa die Hälfte mit 231 (2010) positiven Befunden ( $174 \pm 141$ ). Beim Abfall der Anzahl der *C. difficile* Anforderungen sowie der Toxin-positiven Befunde muss jedoch die unvollständige Datenlage in knapp einem Drittel des Jahres 2010 beachtet werden.

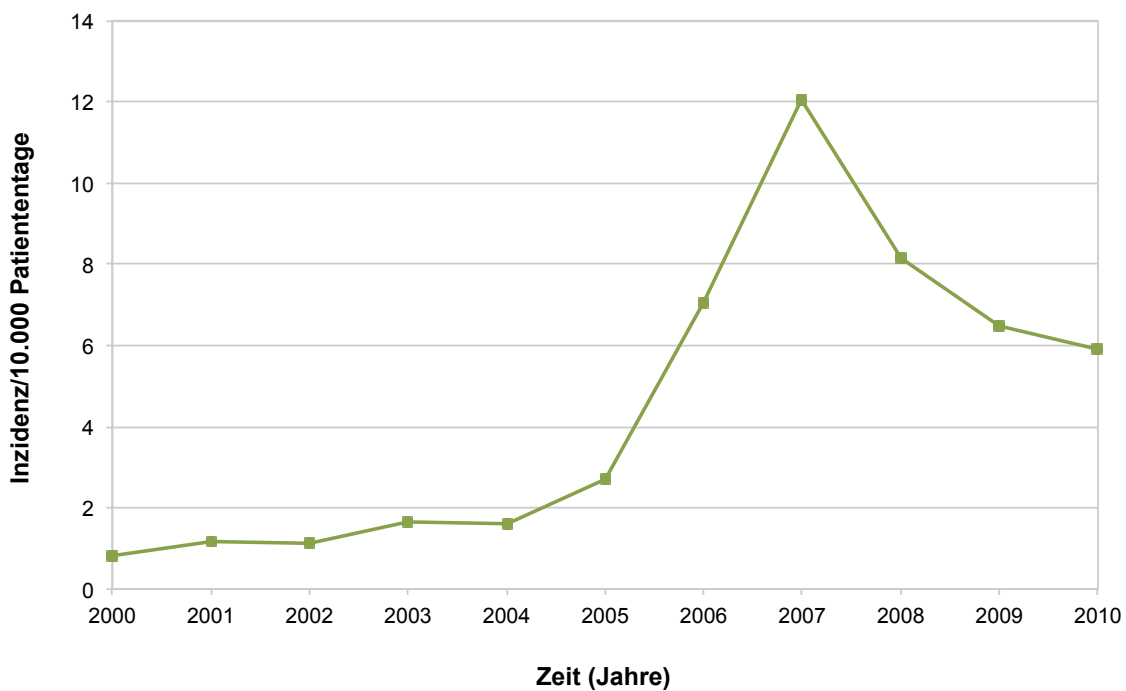


**Abb. 4-1a** absolute Häufigkeiten aller Stuhlproben, der *C. difficile* Anforderungen und der Toxin A/B positiven Befunde

In den Jahren 2001 bis 2009 war eine signifikante Zunahme von 44,3 % (von 14,8 auf 59,1 %) der *C. difficile* Anforderungen bezüglich aller eingegangenen Stuhlproben zu vermerken (Abb. 4-1b). Seit 2007 stabilisierten sich die relativen Häufigkeiten der *C. difficile* Anfragen auf einem hohen Level ( $37,5 \pm 14,4$  %). Das Verhältnis von Toxin-positiven Befunden zu *C. difficile* Anforderungen stieg in den letzten Jahren am UKS ebenfalls signifikant an ( $9,9 \pm 4,1$  %), wobei sich die relativen Häufigkeiten diesbezüglich seit 2006 auf einem Plateau befanden. Nichtsdestotrotz spiegelt sich der Peak wider, der sich schon bei den absoluten Häufigkeiten zeigte. 2007 waren somit 18,1 % der diagnostischen Stuhlproben, die auf *C. difficile* getestet wurden, Toxin-positiv; eine Differenz von 12,4 % im Vergleich zum Jahr 2000.



**Abb. 4-1b** relative Häufigkeiten der *C. difficile* Anforderungen bzgl. aller Stuhlproben und der Toxin A/B positiven Befunde bzgl. aller *C. difficile* Anforderungen



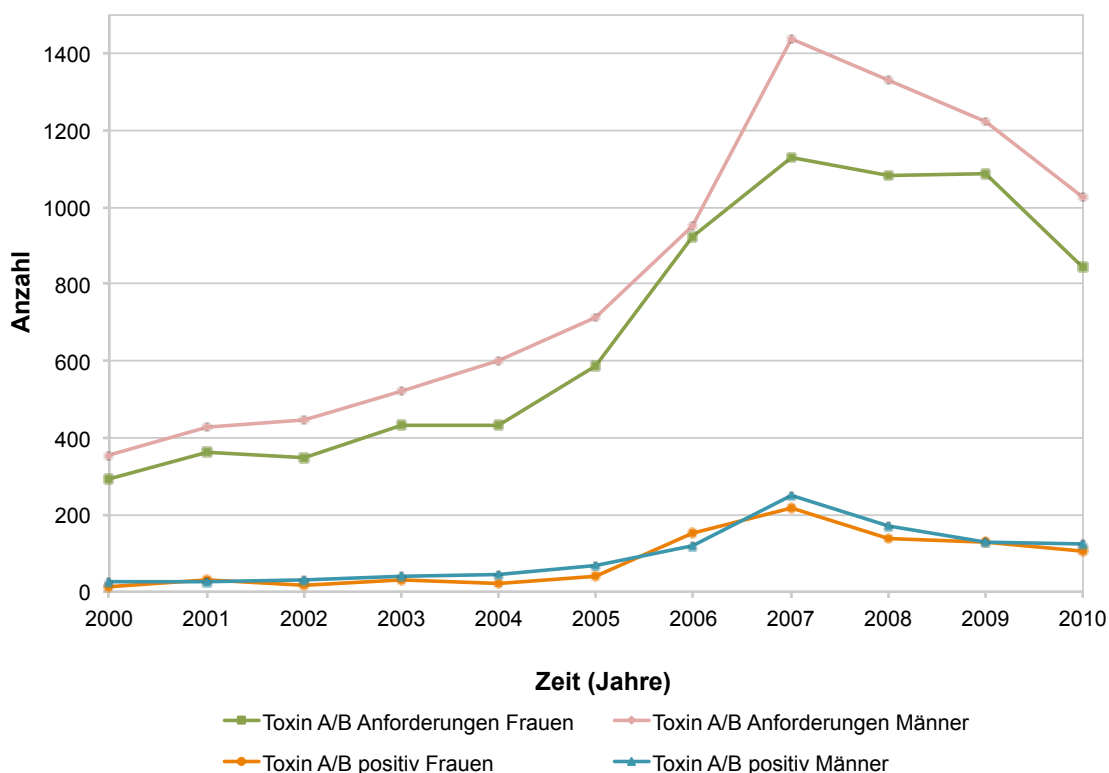
**Abb. 4-1c** Inzidenz der Toxin A/B positiven Befunde pro 10.000 Patiententage

Die o. g. Verhältnisse für die Toxin-positiven Befunde spiegeln sich auch in Relation zu den Gesamtpatiententagen pro Jahr wider (Abb. 4-1c). Die Zunahme der Inzidenz ( $4,4 \pm 3,7$  pro 10.000 Patiententage) steigerte sich seit 2000 mit einer Inzidenz von 0,8 Fällen jährlich bis zu einem Gipfel im Jahr 2007 mit 12,1 Fällen pro 10.000 Patiententage auf etwa das 15-fache. Bis 2010 fiel die Inzidenz wieder auf circa die Hälfte mit 5,9 Fällen pro 10.000 Patiententage ab.

#### 4.1.2 Patientencharakteristik

##### Geschlechtsspezifische Unterschiede

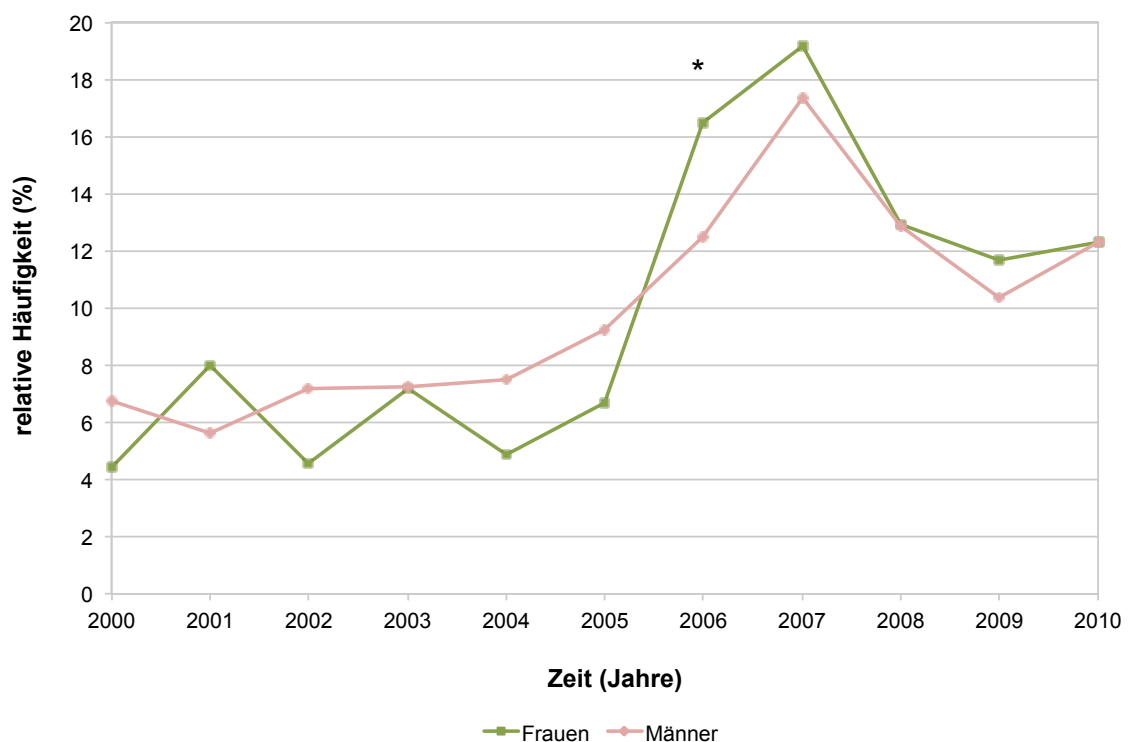
Die Zahl der Anforderungen nach einer *C. difficile* Diagnostik sowie die entsprechenden positiven Befunden waren bei Männern und Frauen annähernd gleich (Abb. 4-2a).



**Abb. 4-2a** absolute Häufigkeiten der *C. difficile* Anforderungen und der Toxin A/B positiven Befunde von Männern bzw. Frauen

Wie bei den Gesamtzahlen (Abb. 4-1a) zeigte sich bis 2007 eine stetige Zunahme der Anforderungen (Männer: von 355 auf 1436, Frauen: von 293 auf 1131) bzw. positiven Proben (Männer: von 24 auf 249, Frauen: von 13 auf 217) und eine darauffolgende Abnahme deren Häufigkeiten (Anforderungen der Männer: auf 1025, der Frauen: auf 844 bzw. positive Befunde der Männer: auf 126, der Frauen: auf 104). Die *C. difficile* Anforderungen für Männer ( $822 \pm 390$ ) lagen in allen elf Jahren über denen der Frauen ( $684 \pm 333$ ). Auch bei den Toxin-positiv getesteten Proben lag die Anzahl bei den Männern ( $93 \pm 73$ ), mit Ausnahme der Jahre 2001 und 2006, über der der Frauen ( $81 \pm 70$ ).

Die relativen Häufigkeiten der Toxin-positiven Befunde bei Männern ( $9,9 \pm 3,5 \%$ ) und Frauen ( $9,8 \pm 5,0 \%$ ) wiesen ab 2000 eine Zunahme bis 2007 auf, anschließend fiel der Prozentsatz bis 2010 wieder (Abb. 4-2b). Auffällig war, dass bis auf das Jahr 2006 ( $p < 0,05$ ) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern gefunden werden konnten.



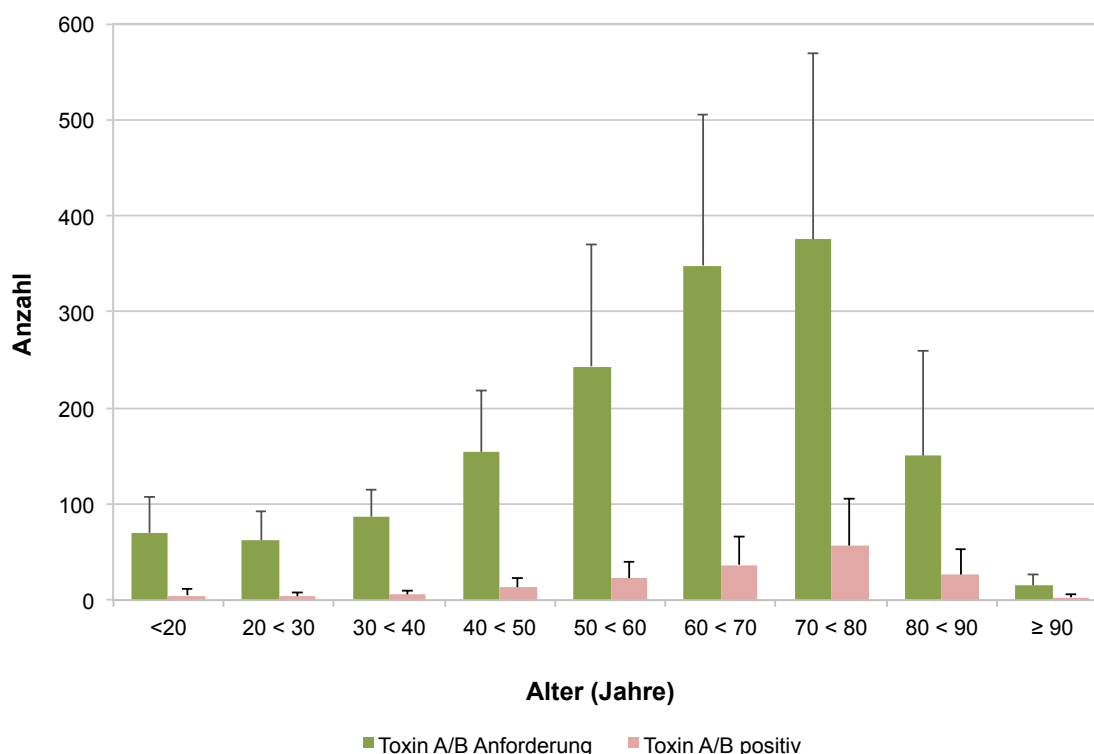
**Abb. 4-2b** relative Häufigkeiten der Toxin A/B positiven Befunde aller *C. difficile* Anforderungen von Männern bzw. Frauen (\*  $p < 0,05$ )



### Altersspezifische Unterschiede

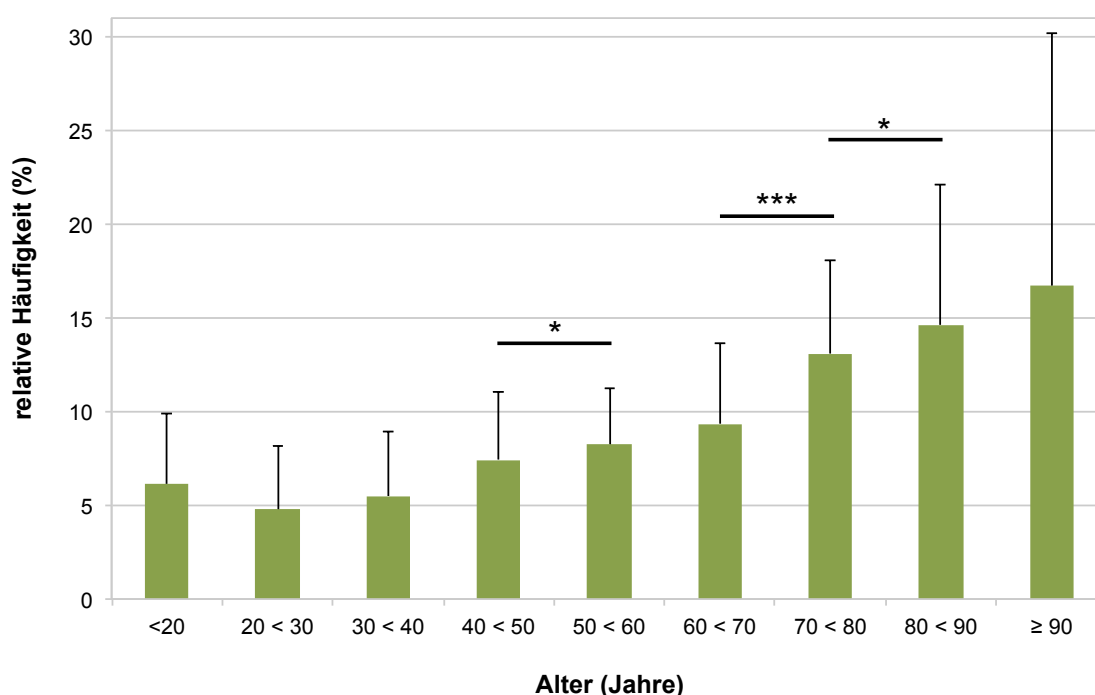
Bei den Altersklassen wurden die Unter-Zwanzig-Jährigen zusammengefasst und die folgenden Gruppen in Zehn-Jahresintervalle aufgeteilt. Die Mittelwerte von 2000 bis 2010 (Abb. 4-2c) wiesen in allen zehn Jahren den gleichen Verlauf, jedoch in unterschiedlich starker Ausprägung, auf.

Bei den Gruppen der unter 40-jährigen fanden sich auf niedrigem Niveau kaum Unterschiede bezüglich der Häufigkeiten der *C. difficile* Anforderungen und der Positivproben. Im Verlauf zeigten sowohl die Anforderungen als auch die Toxin-positiven Befunde eine kontinuierliche Zunahme mit steigendem Lebensalter. Nach dem deutlichen Peak zwischen dem 70. und 80. Lebensjahr mit  $375,1 \pm 193,6$  Anforderungen bzw.  $56,9 \pm 48,9$  Toxin-positiven Proben waren die Häufigkeiten für beide Parameter wieder deutlich rückläufig.



**Abb. 4-2c** *C. difficile* Anforderungen und Toxin A/B positive Proben verschiedener Altersklassen. Mittelwerte und Standardabweichungen der Jahre 2000 - 2010

Auch die relativen Häufigkeiten der positiven Toxinbefunde in ihrer jeweiligen Altersklasse (Abb. 4-2d) zeigten bei annähernd gleichen Prozentsätzen der unter 40-jährigen eine entsprechend dem Lebensalter kontinuierliche Zunahme. Der Satz an positiven Befunden verdreifachte sich mit zunehmendem Alter von  $4,8 \pm 3,4$  % zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr auf  $14,6 \pm 7,5$  % zwischen dem 80. und 90. Lebensjahr und stieg nochmals um 2,2 % zwischen der 90. und 100. Dekade ( $16,8 \pm 13,6$  %). Signifikante Unterschiede zu den unter 40-jährigen zeigten sich gegenüber allen Altersgruppen der über 40-jährigen. Des Weiteren wurden zwischen den 30 – 40-jährigen und den 40 – 50-jährigen ( $p < 0,05$ ), den 60 – 70-jährigen und den 70 – 80-jährigen ( $p < 0,001$ ) sowie der darauffolgenden Gruppe ( $p < 0,05$ ) signifikante Unterschiede gefunden.



**Abb. 4-2d** relative Häufigkeiten der Toxin A/B positiven Befunde bzgl. aller *C. difficile* Anforderungen verschiedener Altersklassen. Mittelwerte und Standardabweichungen der Jahre 2000 – 2010 (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

### 4.1.3 Saisonale Verteilung

Die relativen Häufigkeiten der Toxin-positiven Stuhlproben pro Monat der Jahre 2000 bis 2010 zeigten keine wiederkehrende jahreszeitliche Rhythmik (Abb. 4-3a). Eine saisonale regelmäßige Wiederkehr Toxin-positiver Infektionen war also nicht erkennbar; signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Monaten wurden nicht gefunden. Der niedrigste Mittelwert aller zehn Jahre fand sich mit  $6,7 \pm 5,1$  % Toxin-positiver Befunde aller eingesandten Proben im März, die maximale mittlere relative Häufigkeit lag im Mai mit  $18,5 \pm 18,7$  % und hat somit zum nächstliegenden Monat Juni ( $14,0 \pm 9,0$ ) einen Abstand von knapp 4,5 %. Im Jahr 2010 lag im Monat Mai ein einmaliger Höchstwert von 69,0 % vor, der diesen Unterschied bedingte. Von Mai bis September ( $9,0 \pm 4,3$  %) nahmen die Mittelwerte ab und stiegen bis Dezember ( $12,9 \pm 9,1$  %) wieder kontinuierlich an. Dieser Verlauf bestätigte sich bei der Auswertung der einzelnen Häufigkeiten der Jahre 2000 bis 2010 aber nicht.

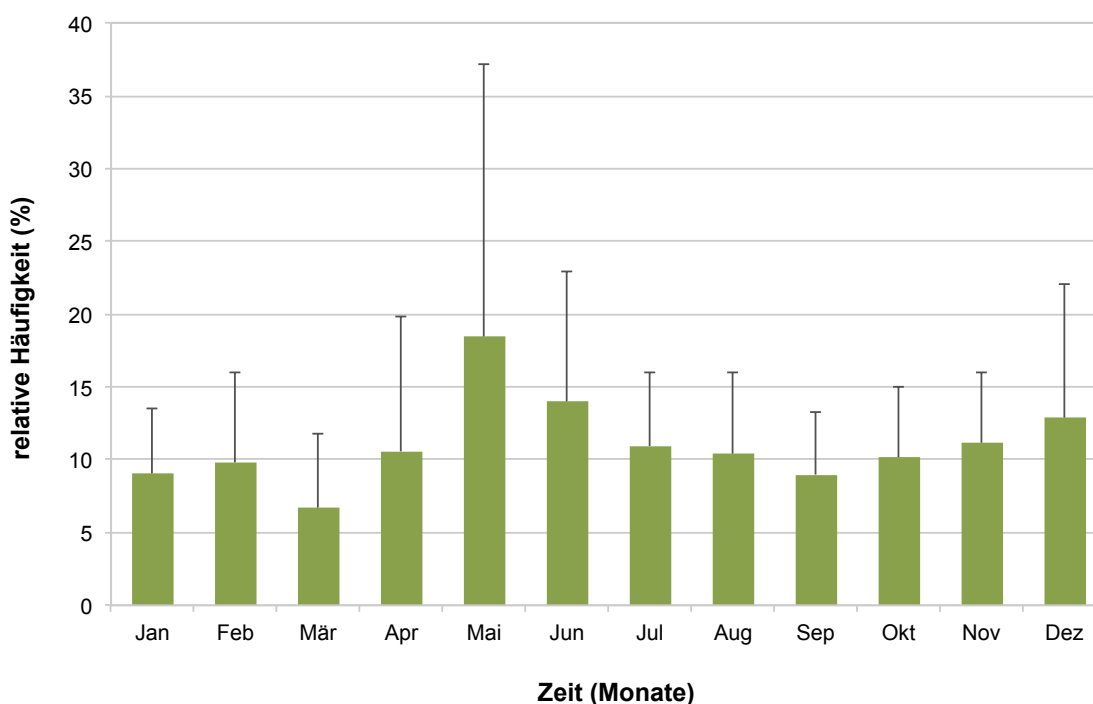
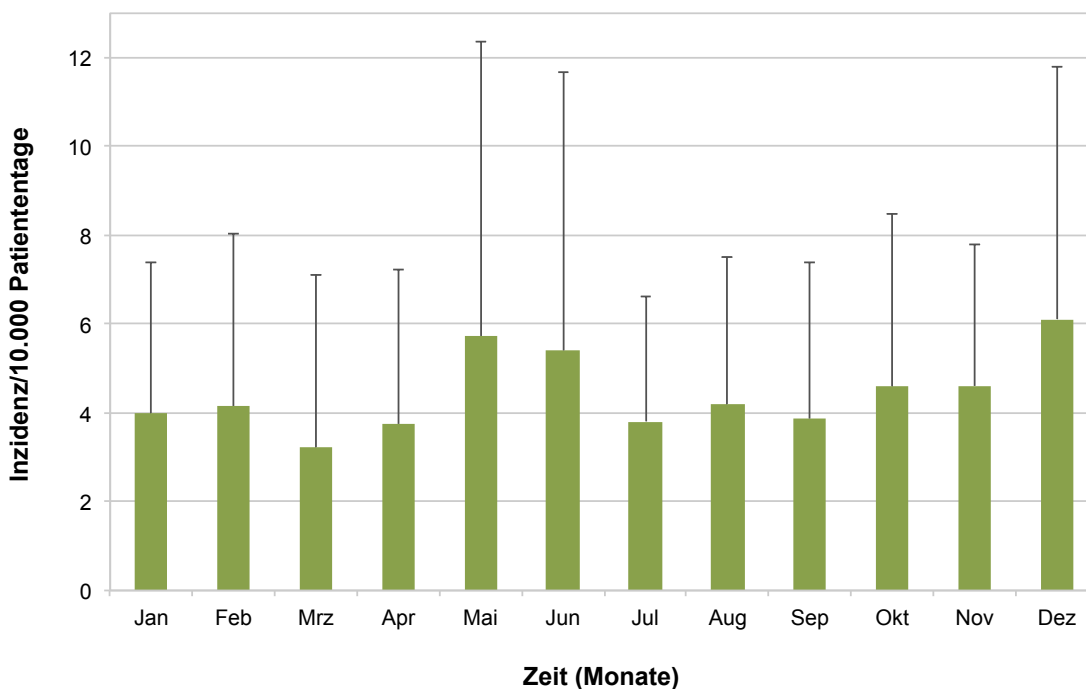


Abb. 4-3a saisonale relative Häufigkeit der Toxin A/B positiven Befunde

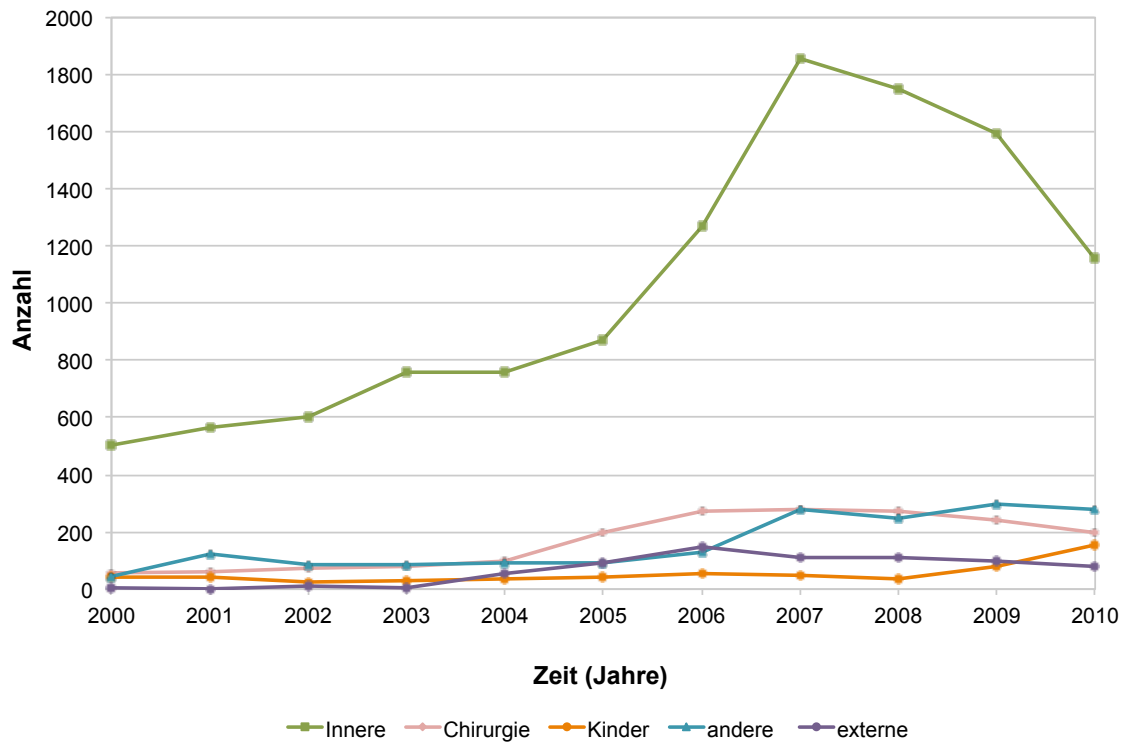
Die Inzidenz pro 10.000 Patiententage (Abb. 4-3b) zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede bezüglich einer saisonalen Häufung an Toxin-positiven Stuhlproben. Das durchschnittliche Maximum lag im Dezember mit  $6,1 \pm 5,7$  Fällen pro 10.000 Patiententagen, das durchschnittliche Minimum im März ( $3,2 \pm 3,9$  Fälle pro 10.000 Patiententage).



**Abb. 4-3b Saisonale Inzidenz der Toxin A/B positiven Befunde pro 10.000 Patiententage**

#### 4.1.4 Befunde der verschiedenen Fachrichtungen

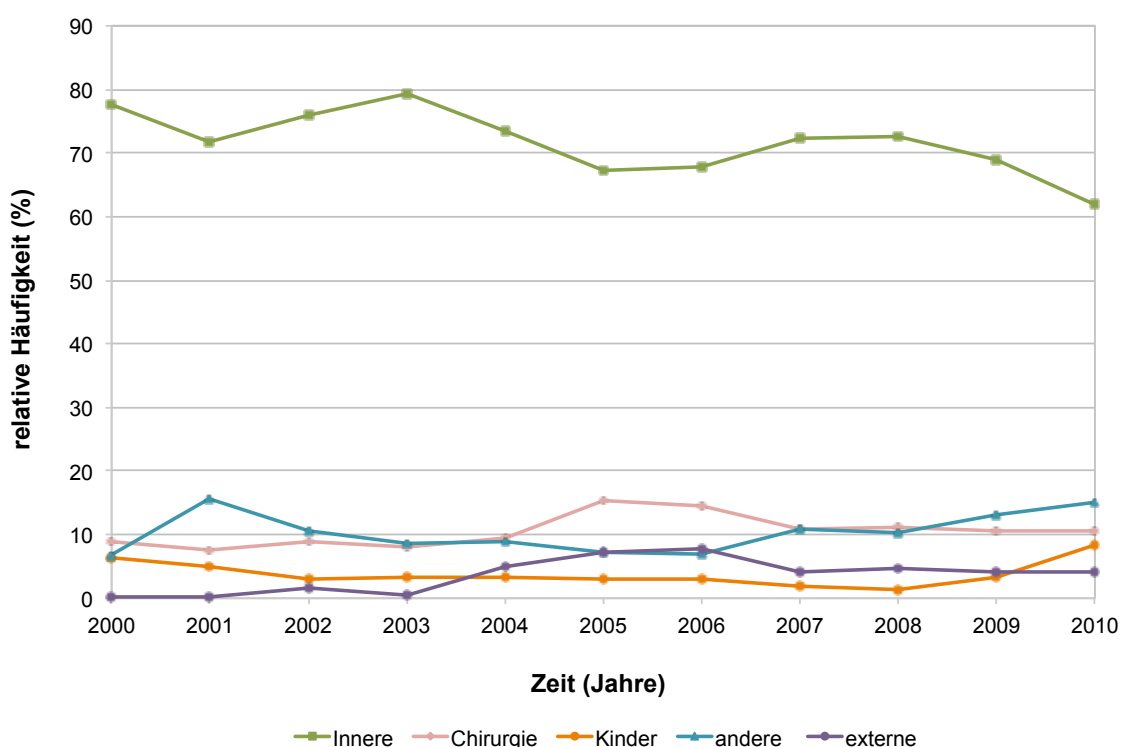
Die analysierten Stuhlproben wurden von den verschiedenen Kliniken des UKS sowie von externen Krankenhäusern bzw. Ärzten eingesandt. Dabei erfolgte die Untergliederung in internistische, chirurgische und pädiatrische Fachabteilungen des UKS sowie in externe Einsender. Alle übrigen Kliniken des UKS wurden zu einer Gruppe („andere“) zusammengefasst. Hierunter fanden sich dermatologische, gynäkologische, HNO-ärztliche, neurologische, orthopädische, radiologische und urologische Stationen.



**Abb. 4-4a absolute Häufigkeiten der *C. difficile* Anforderungen der verschiedenen Fachrichtungen**

Bei den absoluten Zahlen der Einsender (Abb. 4-4a) war zu sehen, dass der generelle Verlauf der Gesamtanforderungen für *C. difficile* mit bis 2007 steigenden, und im Anschluss wieder fallenden Werten auch für die internistischen und chirurgischen Stationen galt. Ein stetiger Anstieg von 503 auf 1855 angeforderter *C. difficile* Nachweise von 2000 bis 2007 und anschließendem Abfall auf 1157 Proben 2010 wurde für die Kliniken für Innere Medizin ( $1063 \pm 492$ ) nachgewiesen, die damit mit Abstand die meisten Proben zur Diagnostik in unser Labor eingesandt haben. In der Chirurgie ( $166 \pm 93$ ) erfolgte ein geringer Anstieg von 2000 bis 2004 von 57 auf 99 Proben, bis 2005 verdoppelte sich die Anzahl jedoch (198 Proben). Der Höchstwert lag im Jahr 2007 bei 276 *C. difficile* Anforderungen. Bis 2010 sank dieser dann wieder auf das Niveau von 2005 mit 197 Anforderungen. Die Anforderungen der Kinderkliniken ( $53 \pm 37$ ) stellten den geringsten Teil der Gesamtanforderungen dar. Die Gesamtzahlen lagen bis 2008 zwischen 25 (2002) und 56 Anfragen (2006), in den darauffolgenden Jahren war

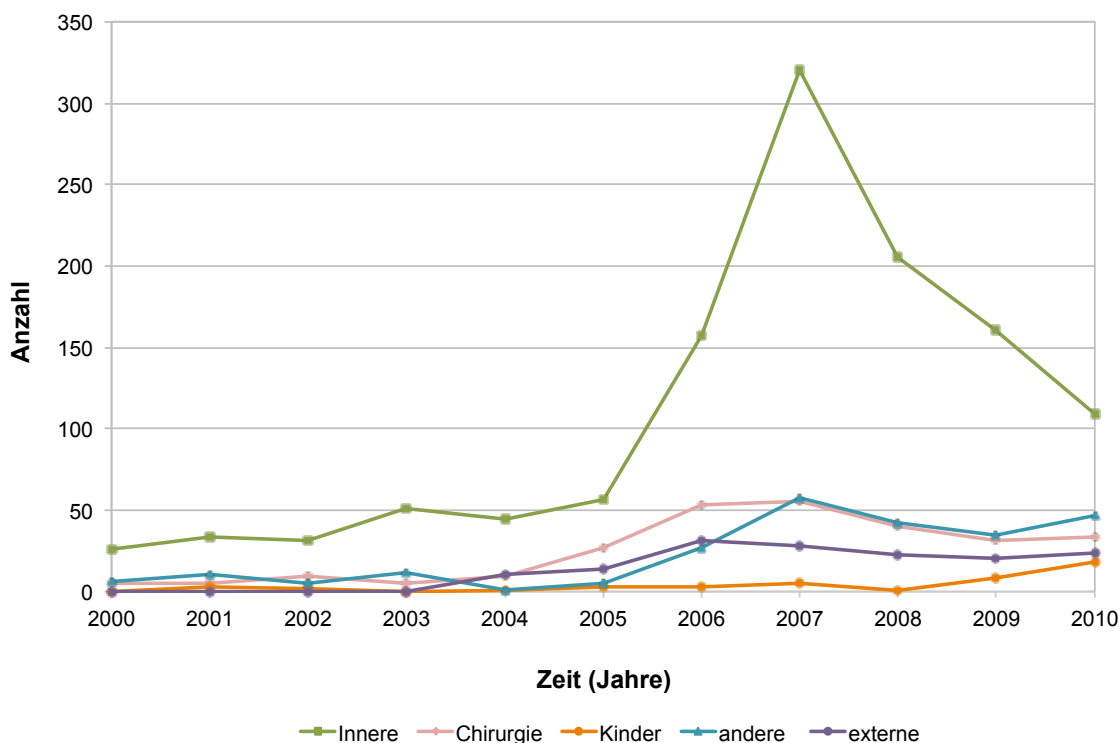
bis 2010 eine Zunahme auf 155 Proben zu vermerken. Die Anzahl derer *C. difficile* Anforderungen, die der Gruppe der übrigen oben aufgezählten Kliniken des UKS ( $160 \pm 97$ ) zuzuordnen sind, waren in ihrer Tendenz steigend, mit einem Minimalwert von 44 Einsendungen 2000 und einem Maximalwert von 300 Einsendungen 2009. Die Anzahl der externen Einsendungen aus dem Saarland ( $64 \pm 52$ ) machten, ähnlich der Kinderkliniken, nur einen geringen Anteil aus. Sie nahmen bis 2006 zu, von einer Anforderung 2001 auf 145 Anforderungen. Ab 2007 lagen die absoluten Zahlen dann niedriger, zwischen 79 und 113 Anfragen.



**Abb. 4-4b** relative Häufigkeiten der *C. difficile* Anforderungen der verschiedenen Fachrichtungen bzgl. aller Gesamtanforderungen pro Jahr

Die Kliniken für Innere Medizin ( $71,7 \pm 5,1$  %) machten sichtbar den größten prozentualen Anteil an allen *C. difficile* Anforderungen pro Jahr gegenüber den übrigen Kliniken aus (Abb. 4-4b). Eine leicht abfallende Tendenz von 77,6 % im Jahr 2000 zu 61,9 % im Jahr 2010 wurde nachgewiesen. Mit durchschnittlich 61,2 % folgte die Chirurgie ( $10,5 \pm 2,4$  %) mit relativen Häufigkeiten zwischen 8,2 (2003) und 15,2 % (2006). Ähnliches zeigte sich für die Gruppe

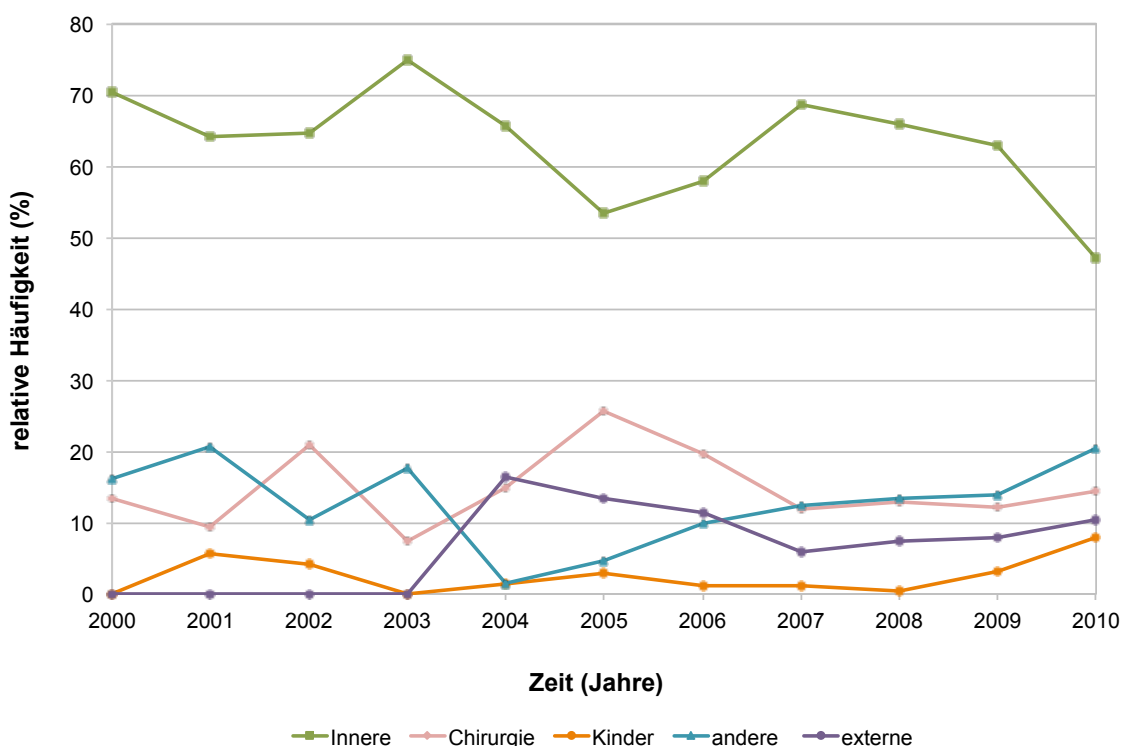
„andere“ ( $10,4 \pm 3,1 \%$ ); den prozentual geringsten Anteil der Gesamtanforderungen machten die Kinderklinik ( $3,8 \pm 2,0 \%$ ) und die externen Einsender ( $3,6 \pm 2,7 \%$ ) aus.



**Abb. 4-4c absolute Häufigkeiten der Toxin A/B positiven Befunde der verschiedenen Fachrichtungen**

Bezüglich der absoluten Häufigkeiten der positiven Toxinbefunde (Abb. 4-4c) zeigte sich für die internistischen Kliniken des UKS ( $109 \pm 94$ ) insgesamt eine steigende Tendenz. Bis 2005 erfolgte nur eine geringe Zunahme auf niedrigem Niveau. Im Jahr 2006 kam es dann zu einem sprunghaften Anstieg auf etwa die dreifache Menge (157), die sich im Jahr 2007 nochmals auf 320 Positivbefunde verdoppelte. In den darauffolgenden Jahren nahm der Wert bis 2010 wieder um ein Drittel ab (109). Die positiven Ergebnisse aus den chirurgischen Kliniken waren entsprechend der Zahl der Anforderungen deutlich geringer ( $25 \pm 19$ ). Die geringste Anzahl der Toxin-positiv befundeten Proben lag in den Jahren 2000, 2001 und 2003 mit jeweils fünf Proben. Dieser Wert verzehnfachte sich etwa bis 2007 auf 55. Die positiven Befunde der Stationen der Kinderklinik ( $4 \pm 5$ ) nahmen,

entsprechend der steigenden Zahl an Gesamtanforderungen für *C. difficile*, zu. Die Zahlen lagen hierbei bis 2008 zwischen null und fünf auf Toxin positiv getestete Stuhlproben und stiegen bis 2010 auf 18 positive Proben an. Alle übrigen Kliniken des UKS, die Stuhlproben eingesandt haben, zeigten Zahlen zwischen einer Toxin-positiven Einsendung im Jahr 2004 bis zu einem Maximalwert von 58 Positivbefunden im Jahr 2007 ( $23 \pm 20$ ). Toxin-positive Befunde von externen Einsendern aus dem Saarland ( $14 \pm 12$ ) waren erst ab 2004 zu verzeichnen. Der Maximalwert lag bei 31 Toxin-positiven Proben im Jahr 2006.

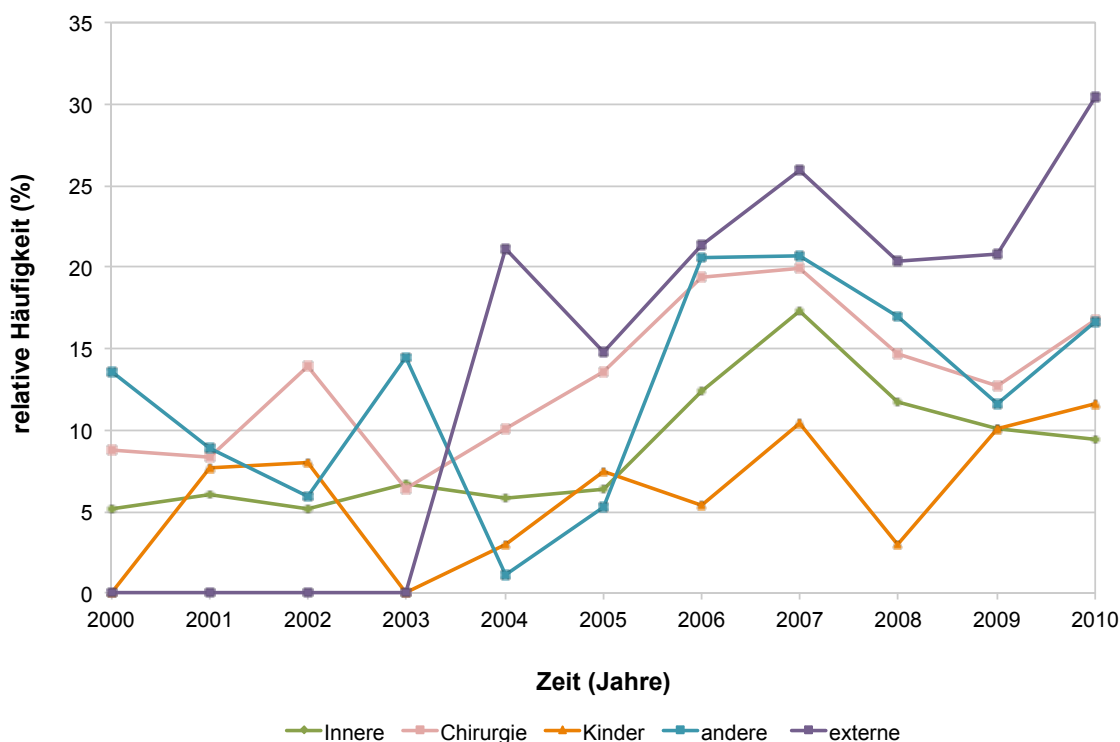


**Abb. 4-4d** relative Häufigkeiten der Toxin A/B positiven Befunde bzgl. aller Toxin A/B positiven Proben pro Jahr

Prozentual (Abb. 4-4d) stellte sich anteilig an allen positiven Proben eines Jahres für die Kliniken für Innere Medizin ( $63,2 \pm 7,9 \%$ ), wie schon bei den *C. difficile* Anforderungen, der deutlich größte Teil an positiven Befunden dar. Hierbei fand sich 2003 ein Maximalwert von 75,0 % und 2010 ein Tiefstwert von 47,2 %. Der Anteil der Positivproben aus der Chirurgie an der Gesamtzahl pro Jahr ( $14,8 \pm 5,3 \%$ ) lag zwischen einem Minimalwert von 7,4 % (2003) und einem Peak von



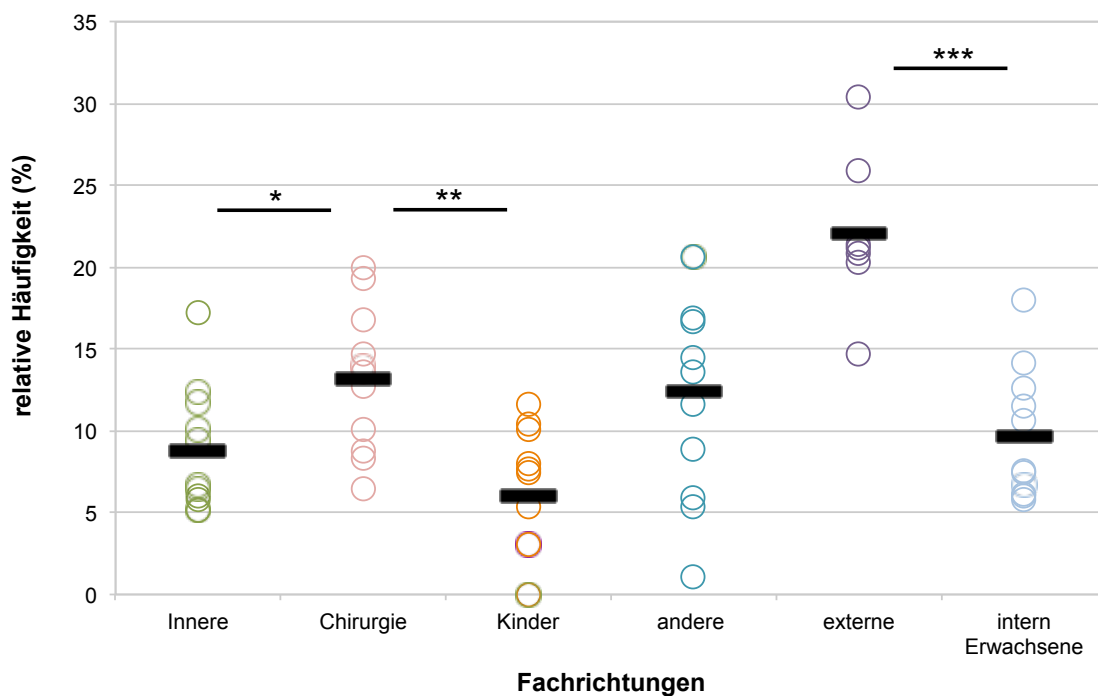
25,7 % (2005) und damit durchschnittlich 48,4 % unter den Werten aus der Inneren Medizin. Es folgten in absteigender Reihenfolge der Anteile an den gesamten Toxin-positiven Proben pro Jahr die sonstigen Kliniken des UKS (12,8  $\pm$  6,0 %), die externen Einsender (6,6  $\pm$  6,0 %) und die Kinderklinik (2,5  $\pm$  2,5 %).



**Abb. 4-4e** relative Häufigkeiten der Toxin A/B positiven Befunde der jeweiligen Fachrichtung bzgl. aller Anforderung dieser Gruppe pro Jahr

Das Verhältnis der relativen Häufigkeiten der Toxin-positiven Stuhlproben eines Fachbereichs pro Jahr zu den *C. difficile* Anforderungen dieser Gruppe pro Jahr (Abb. 4-4e) zeigte für die internistischen Kliniken (8,7  $\pm$  3,8 %) wiederum einen Peak für das Jahr 2007. Der Prozentanteil der positiven Toxinbefunde bezogen auf die Gesamtanforderung dieses Einsenders pro Jahr stieg von 5,2 % (2000) auf 17,3 % (2007) um über 10 % und fiel in den darauffolgenden Jahren wieder auf 9,4 % (2010) ab. Hingegen war eine steigende Tendenz der positiven Befunde für die chirurgischen und pädiatrischen Kliniken des UKS, sowie für die externen Einsender zu verzeichnen. Der prozentuale Anteil an auf Toxin positiv getesteten Stuhlproben aus der Chirurgie (13,1  $\pm$  4,4 %) wies eine Spanne von 13,5 % auf,

mit einem Tiefstwert von 6,4 % (2003) und einem Höchstwert von 19,9 % (2007). In der Kinderklinik ( $6,1 \pm 4,1$  %) lagen im Jahr 2000 und 2003 keine Toxin-positiven Befunde vor, im Jahr 2010 waren es dagegen 11,6 %. Die stärkste Zunahme für die Toxin-positiven Befunde innerhalb einer Gruppe fand sich bei den externen Einsendern ( $14,1 \pm 11,8$  %). Seit 2004 (21,2 %) stieg die relative Häufigkeit um 9,2 % bis 2010 (30,4 %) an. Für die Gruppe der anderen Kliniken des UKS ( $12,4 \pm 6,4$  %) war keine eindeutige Tendenz zu verzeichnen. Der Prozentsatz für die positiv getesteten Proben unter dieser Einsendergruppe lag zwischen 1,1 % (2004) und 20,6 % (2006, 2007).

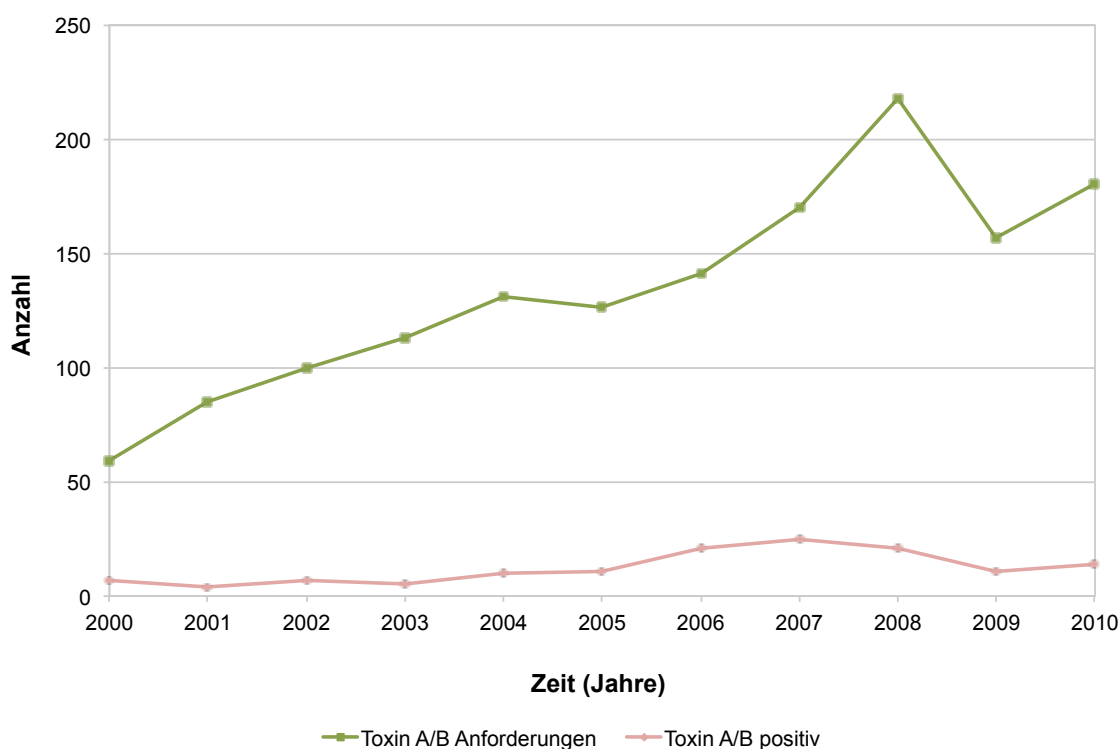


**Abb. 4-4f** relative Häufigkeiten der Toxin A/B positiven Befunde der jeweiligen Fachrichtung bzgl. aller Anforderung dieser Gruppe (— = Mittelwert; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

Im Durchschnitt (Abb. 4-4f) zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den positiven Befunden der chirurgischen Patienten gegenüber den internistischen ( $p < 0,05$ ) und den pädiatrischen Patienten ( $p < 0,01$ ). Auffällig war außerdem, dass die Anzahl der von extern gegenüber der von intern (ausgenommen Kinderklinik) eingesandten Proben mit positivem Toxinbefund signifikant höher war ( $p < 0,001$ ).

#### 4.1.5 Intensivpatienten

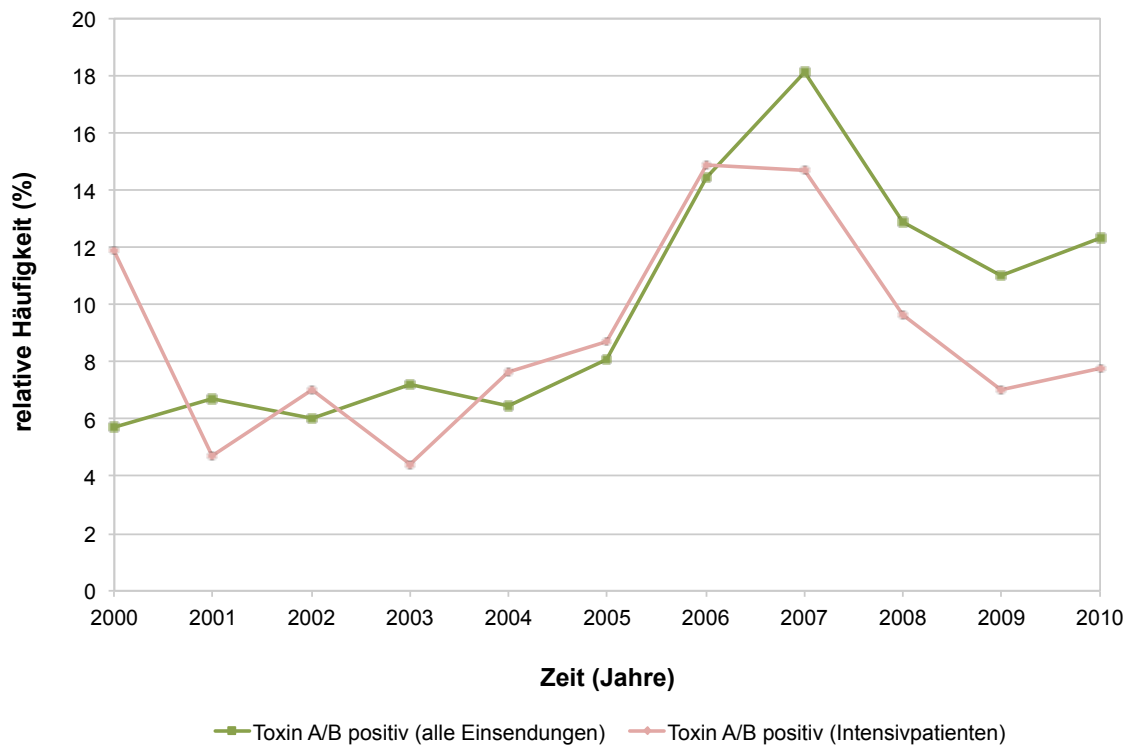
Mögliche Unterschiede bezüglich Toxin-Positivität zwischen Patienten von Intensiv- und Normalstationen wurden durch die Auswertung der Befunde der verschiedenen intensivmedizinischen Stationen des UKS eruiert.



**Abb. 4-5a absolute Häufigkeiten der *C. difficile* Anforderungen und der Toxin A/B positiven Befunde von Intensivpatienten**

Bezüglich der absoluten Häufigkeiten der Anforderungen nach einer *C. difficile* Diagnostik bei Intensivpatienten (Abb. 4-5a) war eine deutliche Zunahme über die Jahre 2000 bis 2010 ( $134,5 \pm 45,5$ ) zu sehen. Angefangen mit einer Zahl von 59 Anforderungen im Jahr 2000 erreichten die Werte einen Peak mit 218 Anforderungen im Jahr 2008, die Zahl der *C. difficile* Anfragen stieg somit um den Faktor 3,7. Im Vergleich zu den absoluten Häufigkeiten der Anforderungen stiegen die der Toxin-positiven Befunde der Intensivpatienten ( $12,4 \pm 7,1$ ) um den Faktor 6,3 zwischen dem Tiefstwert im Jahr 2001 mit vier Toxin-positiv getesteten Stuhleinsendungen und dem Höchstwert von 25 Toxin-positiven Proben im Jahr 2007, im Vergleich zu den Anforderungen also um knapp das Doppelte. In den

Folgejahren zeigten sich weniger Toxin-positive Befunde mit einem Minimum von elf positiv getesteten Proben 2009.



**Abb. 4-5b** Relative Häufigkeiten Toxin A/B positiver Befunde von Intensivpatienten und Toxin A/B positiver Befunde aller Patienten

Prozentual (Abb. 4-5b) stellte sich eine Zunahme der relativen Häufigkeit der positiven Toxin-Einsendungen der Intensivpatienten ( $8,9 \pm 3,6 \%$ ) von 2001 bis 2006 um 10,2 % dar (von 4,7 auf 14,9 %), mit einem darauffolgenden Abfall um 7,9 % bis zum Jahr 2009 (auf 7,0 %). Die Häufigkeiten der positiven Toxinbefunde zeigten zwar deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Jahren, jedoch keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den relativen Häufigkeiten von auf Toxin positiv getesteten Stuhlproben aller Patienten ( $9,9 \pm 4,1 \%$ ).

## 4.2 Bedeutung von diskrepanten Antigen-Befunden

Im Rahmen der empfohlenen Zwei-Stufen-Diagnostik kommt es häufig zu diskrepanten Befunden. Im prospektiven Teil dieser Arbeit wurden 101 Stuhlproben mit GLDH-positivem und Toxinantigen-negativem Ergebnis, die in einem Zeitraum von sechs Monaten (März bis August 2011) gesammelt wurden, mittels Multiplex-PCR (Hain Lifescience) als unabhängiger hochsensitiver Bestätigungstest insbesondere auf das Vorliegen der Toxingene *tcdA*, *tcdB* und *cdtA/cdtB* untersucht. Neben diesen wurden auch Deletionen des *tcdC*-Gens sowie *gyrA*-Mutationen detektiert. Anschließend erfolgte die Gegenüberstellung zu den Befunden der Kultur aus Nativstuhlproben, des Toxinantigennachweises aus Isolaten und der *slpA*-Sequenzierung.

### 4.2.1 Multiplex-PCR aus Nativstuhlproben

Stuhlproben, die GLDH als common antigen und damit das Vorhandensein von *C. difficile* aufwiesen, bei denen gleichzeitig jedoch kein Toxinnachweis erfolgte, wurden im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht. Gründe für solch diskrepante Ergebnisse können sein:

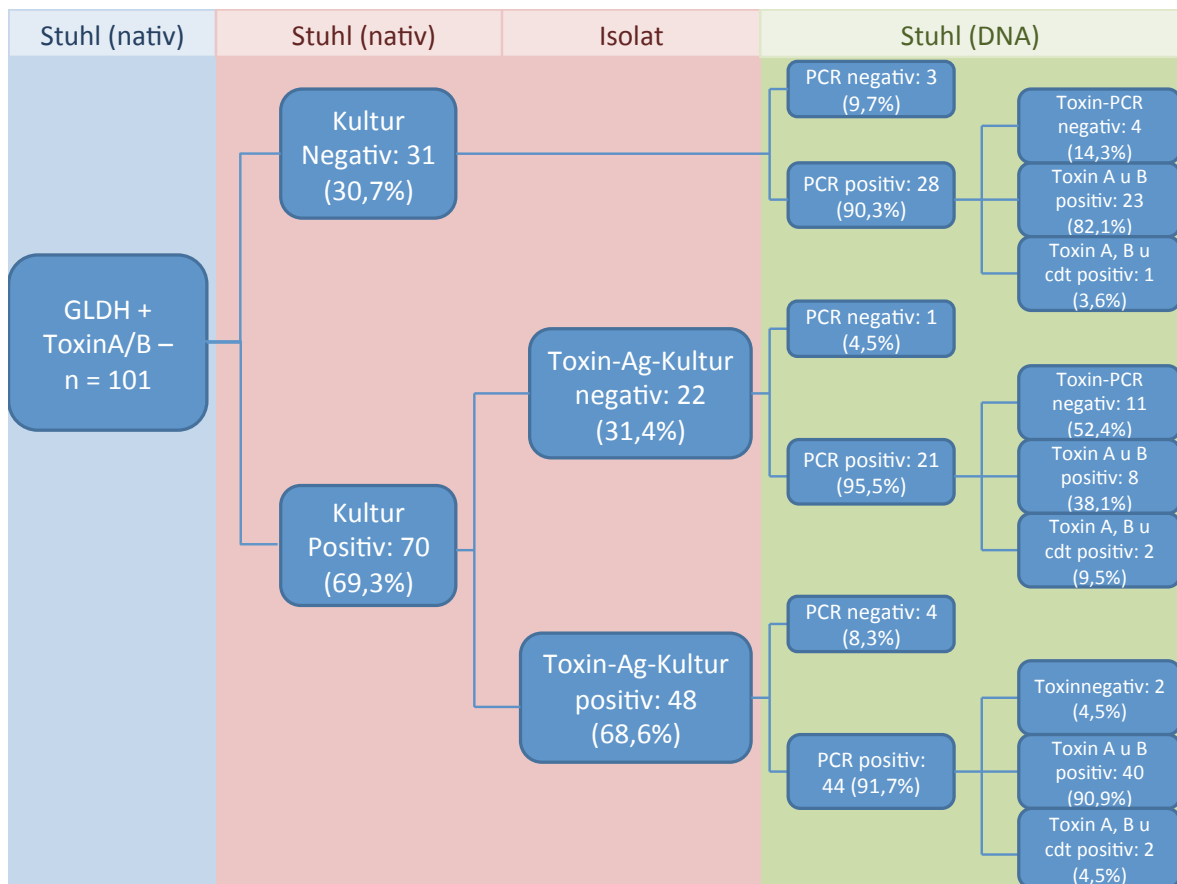
- falsch positiver GLDH-Nachweis
- falsch negativer Toxinnachweis
- Vorliegen eines nicht toxischen *C. difficile* Stammes

Durch verschiedene unabhängige Untersuchungen (Kultur, Toxinantigen-Kultur, Multiplex-PCR) sollte zwischen richtig positiven bzw. negativen und falsch positiven bzw. negativen Befunden differenziert werden. Mit insgesamt 101 GLDH-positiven / Toxin A/B negativen Stuhlproben wurde eine Multiplex-PCR zum unabhängigen Erregernachweis und zur Genotypisierung durchgeführt. Hierbei zeigte die PCR in 7,9 % der Fälle ein negatives Ergebnis für *C. difficile*. Dem entsprechend konnte in 92,1 % der Fälle *C. difficile* mittels PCR nachgewiesen werden. Es war auffällig, dass 81,7 % der für *C. difficile* PCR-positiven Proben

detektierbare Toxingene aufwiesen; 74,2 % *tcdA* und *tcdB*, und 7,5 % zusätzlich für *cdtA/B*. Lediglich für 18,3 % waren tatsächlich keine Toxingene nachweisbar.

Die Toxinantigen-Kultur wurde bei 69,3 % dieser Proben durchgeführt. Sie zeigte in 31,4 % der Fälle ein negatives Ergebnis für Toxinantigene. Beachtlich war, dass bei dem Großteil der Proben (68,6 %) Toxinantigene nachweisbar waren.

Die Ergebnisse der Kultur, der Toxinantigen-Kultur sowie der Multiplex-PCR wurden zueinander in Kontext gesetzt (Abb. 4-6). 30,7 % der Proben für *C. difficile* waren kulturell negativ. In der PCR bestätigte sich dieses Ergebnis jedoch gerade einmal bei 9,7 %, sodass von einem falsch positiven GLDH-Ergebnis ausgegangen werden kann. Die übrigen Nativstuhlproben zeigten in der PCR ein *C. difficile* positives Ergebnis. Daher ist es nahe liegend, dass die Kultur einen falsch negativen Befund erbrachte. Diese Stämme wurden weiter in nicht toxischen und toxischen differenziert. 14,3 % hatten keine Toxingene, 82,1 % die Gene für die Toxine A und B und 3,6 % die Gene für die Toxine A, B und das binäre Toxin. Aus den Isolaten der nativen Stuhlproben, von denen sich eine *C. difficile* Kultur anzüchten ließ, wurde eine Toxinantigen-Kultur angelegt. Hier ließ sich in 31,4 % der Kulturen kein Antigen nachweisen. Das Ergebnis der PCR für diese Gruppe war in 4,5 % der Fälle falsch negativ für *C. difficile*. Bei den übrigen 95,5 % *C. difficile* positiven Kulturen, konnten in der PCR in über der Hälfte der Fälle (52,4 %) keine Toxingene nachgewiesen werden. Trotz negativer Toxinantigen-Kultur zeigte interessanterweise jedoch die andere knappe Hälfte der Proben bei 38,1 % einen Nachweis der Gene für Toxin A und B, und in 9,5 % zusätzlich auch für das binäre Toxin. In diesen Fällen ist am ehesten von einem falsch negativen Ergebnis der Toxinantigen-Kultur auszugehen. Nachweisbare Toxinantigene fanden sich hingegen bei 68,6 % der angezüchteten Isolate. Davon zeigte sich in 8,3 % der Fälle in der PCR kein *C. difficile* Nachweis, also einen falsch negativen Befund, und somit in 91,7 % ein positives Ergebnis für das Bakterium. Von diesen *C. difficile* PCR-positiven Befunden, fand sich in der PCR-Untersuchung bei gerade einmal 4,5 % der Stuhlproben kein Toxingennachweis. Bei 90,9 % waren die Gene für Toxin A und B, und bei weiteren 4,5 % außerdem noch für das binäre Toxin detektierbar.



**Abb. 4-6 Kultur, Toxinantigen-Kultur und Multiplex-PCR im Kontext zueinander**

Die Beurteilung der Befunde (Tab. 4-1) erfolgte im Vergleich zum GLDH / Toxin A/B-EIA. Als falsch positiv oder falsch negativ wurden Befunde gewertet, die durch mindestens zwei unabhängige Methoden widerlegt wurden. Der GLDH-Nachweis war nur in den wenigsten Fällen falsch positiv (3 %). Daneben waren falsch positive Befunde nur bei der Toxinantigen-Kultur zu verzeichnen. Diese waren mit 2 % jedoch kaum vertreten. Auffallend war dagegen, dass der Toxinnachweis mit 79 % die meisten falsch negativen Ergebnisse erbrachte. Die *C. difficile* Kultur folgte bezüglich der Anzahl falsch negativer Befunde mit 28 % an zweiter Stelle. Falsch negative Ergebnisse zeigten auch die Toxinantigen-Kultur (10 %) und am seltensten die *C. difficile* PCR (4 %).

Tab. 4-1 Beurteilung der Ergebnisse aus GLDH / Toxin A/B EIA, Kultur, Toxinantigenkultur und Multiplex-PCR (■ = falsch negativer bzw. falsch positiver Befund)

C. <i>difficile</i> Kultur	Toxin- Ag- Kultur	C. <i>difficile</i> PCR	Toxin- PCR	Beurteilung des Ag-Nachweises		Kommentar	Anzahl	%
				GLDH	Toxin			
-		-	-	falsch +	richtig -	keine Diskrepanzen	3	3,0 %
-		+	-	richtig +	richtig -	C. difficile Kultur falsch -	4	4,0 %
-		+	+	richtig +	falsch -	C. difficile Kultur falsch -	24	23,8 %
+	-	-	-	richtig +	richtig -	C. difficile PCR falsch -	1	1,0 %
+	-	+	-	richtig +	richtig -	keine Diskrepanzen	11	10,9 %
+	-	+	+	richtig +	falsch -	Toxin-Ag-Kultur falsch -	10	9,9 %
+	+	-	-	richtig +	falsch -	C. difficile PCR falsch -	4	4,0 %
+	+	+	-	richtig +	richtig -	Toxin-Ag-Kultur falsch +	2	2,0 %
+	+	+	+	richtig +	falsch -	keine Diskrepanzen	42	41,6 %
							Σ = 101	100 %

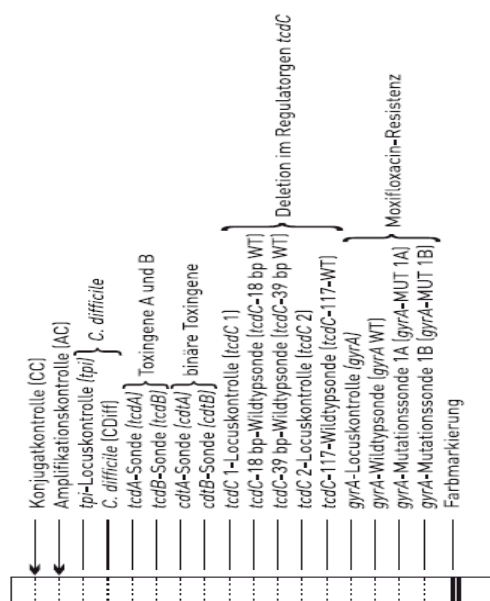
#### 4.2.2 Multiplex-PCR aus *Clostridium difficile* Isolaten

Parallel zu den Nativstuhlproben wurden 22 ausgewählte Isolate mittels Multiplex-PCR untersucht. Anschließend erfolgte zur Ermittlung der Sensitivität ein Vergleich mit den entsprechenden PCR-Ergebnissen der Proben aus nativem Stuhl. Alle ausgewählten Isolate der Kultur-positiven, Toxinantigen-Kultur-negativen Proben zeigten in der PCR einen positiven Befund für *C. difficile*. Jedoch konnte bei 54,5 % der Proben genotypisch ebenfalls kein Nachweis von Toxingenen erfolgen. Dagegen detektierte die PCR trotz negativer Toxinantigen-Kultur in 40,9 % der Fälle die Gene für Toxin A und B, und in weiteren 4,5 % ließen sich zusätzlich noch die Gene des binären Toxins nachweisen.

Bei der vergleichenden Auswertung zeigte sich in 86,4 % ein komplett identisches Ergebnis für die PCR-Ergebnisse der Nativstuhlproben und der korrelierenden Isolate. Bezüglich der Toxingene stimmten 91,0 % der PCR-Ergebnisse überein.



Die im Einzelfall diskrepanten Befunden ließen falsch negative Ergebnisse oder Mischinfektionen vermuten. Die Unterschiede bezogen sich v. a. auf Wildtypsonden, d. h. auf Mutationen im *gyrA*-Gen, welches Hinweise auf eine mögliche Moxifloxacinresistenz gibt oder Mutationen des Regulorgens *tcdC* als Charakteristikum für hochvirulente *C. difficile* Stämme.



Multiplex-PCR der Nativstuhlprobe		Multiplex-PCR des korrelierenden Isolats	Ribotyp
A	<i>C. difficile</i> PCR-negativ	A nicht toxischer Stamm, <i>gyrA</i> -WT	
B	Toxin A, B, cdt, <i>gyrA</i> -WT	Toxin A, B, Deletion <i>tcdC</i> 18bp, <i>gyrA</i> -WT	001
C	Toxin A, B, cdt, <i>gyrA</i> -WT und <i>gyrA</i> 1A Mutation	Toxin A, B, cdt, Deletion <i>tcdC</i> 39bp, <i>gyrA</i> 1A Mutation	078

**Abb. 4-7 Diskrepante Befunde bei der Multiplex-PCR zwischen Nativstuhlprobe und korrelierendem Isolat**

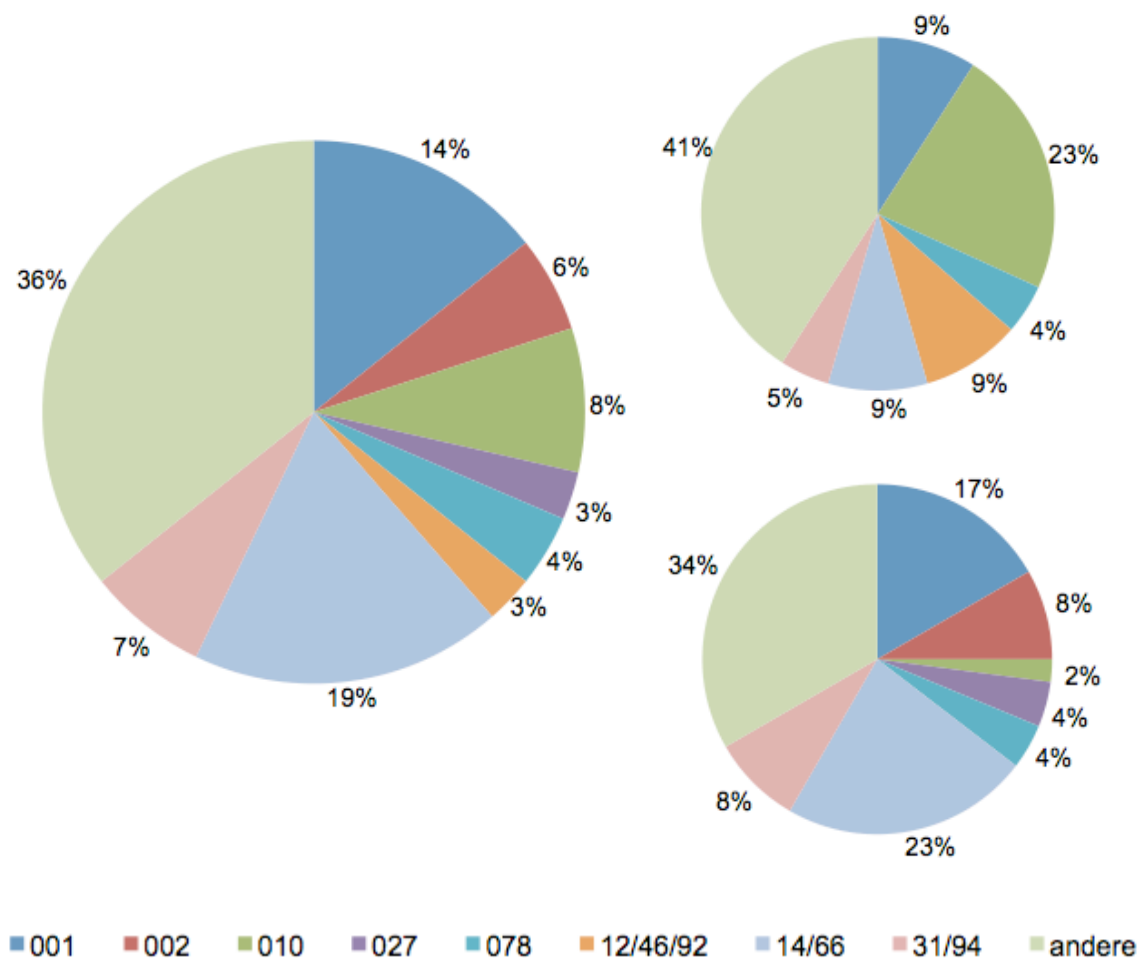
Bei drei (13,6 %) der untersuchten Isolate mit negativem Toxinantigen-Ergebnis zeigten sich in der PCR Diskrepanzen zu den untersuchten Nativstuhlproben (Abb. 4-7). Dabei waren jeweils zwischen zwei und vier Sonden diskrepant. Diese drei Vergleiche wurden in den folgenden Ausführungen mit A, B und C bezeichnet. Bei Stuhlprobe A war das Ergebnis für *C. difficile* negativ, wohingegen das Isolat A

einen positiven *C. difficile* Befund ohne Toxingennachweis ergab, was am ehesten ein falsch negatives Ergebnis der Nativstuhlprobe vermuten lässt. Bei den *C. difficile* positiven Befunden war genotypisch auffällig, dass sich sowohl bezüglich der Toxingene als auch der Resistenzgene jeweils im PCR-Ergebnis aus Nativstuhl mehr Banden anfärbten als aus dem Isolat. Die Proben B zeigten sowohl als Nativstuhlprobe wie auch als Isolat einen Nachweis der Gene der Toxine A und B. Das Vorhandensein dieser beiden Gene ist mit dem diagnostizierten Ribotyp 001 gut vereinbar. Im Stuhl B fanden sich jedoch außerdem die Gene für das binäre Toxin (*cdtA*-, *cdtB*-Sonde). Das Fehlen einer *tcdC*-Sonde im Ergebnis des Isolats B zeigte eine Deletion im entsprechenden Gen an, welche mit einer erhöhten Toxinproduktion einhergeht. Beide Proben C zeigten das Vorliegen der Gene für die Toxine A, B und das binäre Toxin. Diese Befunde unterschieden sich lediglich durch Mutationen im *gyrA*-Gen und im Regulatorgen, die ausschließlich bei dem entsprechenden Isolat vorkamen. Zumindest die Deletion im *tcdC*-Gen ist mit dem hier vorliegenden Ribotyp 078 vereinbar.

#### 4.2.3 Surfacylayer-ProteinA-Sequenztypisierung

Die eingeschlossenen Stuhlproben wurden mittels Sequenztypisierung für Surfacylayer-ProteinA ribotypisiert (Abb. 4-8). Da dies aus Kulturen erfolgt, wurde sie nur bei den 69,3 % *C. difficile* positiven Kulturen der insgesamt 101 GLDH-positiven und Toxinantigen-negativen Proben durchgeführt. In der Gruppe der Toxinantigen-negativen Kulturen fanden sich die verschiedenen nicht-endemischen Ribotypen in 40,9 % der Fälle am häufigsten. Es folgten in absteigender Reihenfolge die Ribotypen 10 (22,7 %), 001, 14/66, 12/46/92 (je 9,1 %) und 078 sowie 31/94 (je 4,5 %). Bei den Kulturen mit positivem Toxinantigen-nachweis ließen sich diverse nicht-endemische Ribotypen in 33,3 % der Proben ebenfalls mit der größten Häufigkeit nachweisen. Des Weiteren wurden die Ribotypen 14/66 (22,9 %), 001 (16,7 %), 002, 31/94 (je 8,3 %), 027, 078 (je 4,2 %) und 10 (2,1 %) sequenziert.

Auffallend war, dass Ribotyp 12/46/92 nur bei den Toxinantigen-Kultur-negativen Proben zu finden war, und die Ribotypen 002 und 027 lediglich bei den Toxinantigen-positiven Proben. Signifikante Unterschiede zeigten sich auch zwischen dem Vorkommen des Ribotyps 10 ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 4-8** slpA-Sequenztypisierung (links: Gesamtheit der Proben; rechts oben: Toxinantigen-Kultur negative Proben; rechts unten: Toxinantigen-Kultur positive Proben)

Bei den verschiedenen Ribotypen und dem in der PCR der entsprechenden Nativstuhlprobe detektiertem genetischen Repertoire bezüglich der Toxingene zeigte sich, dass für denselben Ribotyp keine Toxine, Toxin A und B oder alle drei Toxine genotypisch vorhanden sein können (Tab. 4-2). Selten war trotz des Ribotyp-nachweises ein falsch negatives Ergebnis für *C. difficile* in der PCR vorhanden.

Tab. 4-2 Ribotypen und Gennachweise

Ribotyp		Toxine (PCR)		Mutationen (PCR)	
Bezeichnung	Anzahl	Toxingene	Anzahl (%)	Bezeichnung	Anzahl (%)
andere	25	PCR negativ	2 (8 %)	-	-
		nicht toxischen	8 (32 %)	-	-
		A, B	14 (56 %)	18bp, gyrA1A	2 (8 %)
		A, B, cdt	1 (4 %)	39bp + gyrA1A	1 (4 %)
14/66	13	PCR negativ	2 (15 %)	-	-
		A, B	11 (85 %)	gyrA1A	1 (8 %)
001	10	A, B	9 (90 %)	gyrA1A	5 (50 %)
		A, B, cdt	1 (10 %)	-	-
10	6	nicht toxischen	4 (67 %)	-	-
		A, B	2 (33 %)	117	1 (17 %)
31/94	5	PCR negativ	1 (20 %)	-	-
		nicht toxischen	1 (20 %)	-	-
		A, B	3 (60 %)	-	-
002	4	A, B	4 (100 %)	-	-
078	3	A, B	1 (33 %)	-	-
		A, B, cdt	2 (67 %)	gyrA1A	1 (33 %)
027	2	A, B, cdt	2 (100 %)	18bp + 117 + gyrA1A, 117 + gyrA1A	2 (100 %)
12/46/92	2	A, B	2 (100 %)	-	-
$\Sigma = 70$					

Im Allgemeinen dominierten in dieser Studie die toxischen Stämme mit Ausnahme von Ribotyp 10 (Toxingennachweis in 33 % der Fälle). Dabei zeigten sich die Ribotypen 12/46/92, 001, 002, 078 sowie 027 zu 100 % toxischen. Es folgten die Stämme 14/66 (85 %), 31/94 (60 %) und die endemisch vorkommenden Ribotypen (60 %). Die Gene *cdtA/cdtB* für das binäre Toxin wurden bei Ribotyp 027, wie für diesen Stamm typisch, in allen Fällen nachgewiesen, bei Ribotyp 078 in 67 % der Proben. Seltener fand sich dieses Toxin bei Ribotyp 001 (10 %) und interessanterweise auch bei den endemisch vorkommenden Stämmen (4 %).

Der Großteil der untersuchten Stämme zeigte weder Deletionen des *tcdC*-Gens (93 %) noch Mutationen des *gyrA*-Gens (84 %). Am häufigsten waren diese beiden genotypischen Veränderungen jedoch bei Ribotyp 027 zu finden (100 %), was neben dem binären Toxin die Hypervirulenz dieses Stammes mitbedingt. Deletionen von *tcdC* waren außerdem bei Ribotyp 10 (33 %) und, wenn auch nur

selten, bei den endemisch vorkommenden Stämmen (8 %) nachweisbar. Dagegen waren *gyrA*-Mutationen häufiger zu finden. Neben Ribotyp 027 fanden sie sich interessanterweise mit 50 % am zweithäufigsten bei Ribotyp 10. Es folgte Ribotyp 078 (33 %), Ribotyp 14/66 (8 %) sowie die endemisch vorkommenden Stämme (8 %). Frei von den in dieser Studie untersuchten Mutationen waren lediglich die Ribotypen 31/94, 12/46/92 und 002.

Interessant war, dass bei den drei Proben des Ribotyps 078 nach Durchführung der Multiplex-PCR aus Isolaten, auf allen Membranstreifen das binäre Toxin, sowie die 39bp Deletion detektiert wurden (Abb. 4-7 C). Da dies für Ribotyp 078 typisch ist, war bei den Nativstuhlproben am ehesten eine Mischinfektion mit mehreren Stämmen zu vermuten. Weitere Koinfektionen, oder gegebenenfalls falsch positive Befunde, waren auf Grund des Nachweises der Gene für das binäre Toxin bei den endemisch vorkommenden Stämmen sowie bei Ribotyp 001 naheliegend. Im PCR-Ergebnis des Isolats von Ribotyp 001 (Abb. 4-7 B) ist zu erkennen, dass *cdtA/cdtB* nicht detektiert wurden.

## 5 Diskussion

Bereits vor etwa 30 Jahren konnten toxische *C. difficile* Stämme mit Hilfe eines EIA für Toxin A, später auch kombiniert für Toxin A und B, nachgewiesen werden. Mit Bekanntwerden der geringen Sensitivität dieses Testverfahrens wurde empfohlen, zusätzlich die toxische Kultur durchzuführen. Im Verlauf entwickelten sich zudem verschiedene Methoden zur genaueren Typisierung von *C. difficile*. Die neuesten diagnostischen Ansätze umfassen den Nachweis von GLDH als Suchtest und die genotypische Analyse mittels PCR. Mit Einführung der Multiplex-PCR war es inzwischen gelungen, zeitgleich mehrere Gene für Toxine und Resistenzen zu untersuchen. Heute werden verschiedene Algorithmen zur *C. difficile* Diagnostik diskutiert (Kufelnicka & Kirn, 2011; Schmidt & Gilligan, 2009). Die im retrospektiven Teil dieser Studie verwendeten Daten beruhen auf den Ergebnissen des Toxin A/B Schnelltests, die für den untersuchten Zeitraum von 2000 bis 2010 kontinuierlich vorlagen.

Bedingt durch die Optimierung der diagnostischen Methoden, neuer Testalgorithmen, die veränderte Epidemiologie und die wachsende Aufmerksamkeit gegenüber der *C. difficile* Problematik kam es in den letzten Jahren zu einem Inzidenzanstieg der CDI. Neue hypervirulente Stämme, die sich durch eine erhöhte Toxinsynthese und eine veränderte Resistenzlage auszeichnen, breiteten sich zunächst in Nordamerika und von da aus auch nach Europa aus (Kuijper *et al.*, 2006, 2008; Muto *et al.*, 2005; Pepin *et al.*, 2004). Im Rahmen unserer Studie am UKS war für die Jahre 2000 bis 2007 ein Inzidenzanstieg von 0,9 auf 11,3 Fälle pro 10.000 Patiententage zu verzeichnen. Im Anschluss an diesen Zeitraum war am UKS eine rückläufige Tendenz der CDI Fälle zu verzeichnen, die Inzidenzdichte halbierte sich nahezu von 11,3 im Jahr 2007 auf 5,1 Fälle pro 10.000 Patiententage im Jahr 2010.

Ursachen für den Inzidenzgipfel 2007 waren möglicherweise eine gesteigerte Aufmerksamkeit auf die *C. difficile* Problematik und damit einhergehender intensiver betriebener Diagnostik auf Grund der regionalen Nähe des Saarlandes zu Frankreich. Hier wurde ein Jahr zuvor, 2006, bereits erstmals ein gehäuftes

Vorkommen des hochvirulenten Ribotyps 027 festgestellt (Birgand *et al.*, 2010; Kuijper *et al.*, 2008). Im Herbst 2007 war dieser Stamm auch um Trier, als direkter Nachbarort zum Saarland, endemisch verbreitet (Jansen *et al.*, 2010). Verbessertes Hygienemanagement sowie differenzierterer Einsatz von antibiotischen Medikamenten konnte das Auftreten der CDI am UKS in den Folgejahren eindämmen. Der vermehrte Einsatz vor allem von Flourchinolonen förderte die Verbreitung resistenter *C. difficile* Stämme, sodass eine genauere Indikationsstellung für deren Verwendung in diversen Studien als CDI eindämmende Maßnahme postuliert wurde (Kallen *et al.*, 2009; Pepin *et al.*, 2005).

Deutschlandweit stieg die Inzidenzdichte der CDI parallel zu den am UKS erhobenen Daten von 0,13 2000 auf 9,75 pro 10.000 Patiententage 2006 an (Gastmeier *et al.*, 2009; Vonberg *et al.*, 2007, Vonberg & Gastmeier, 2008). 2007 wurde vom nationalen Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen das Modul für *Clostridium difficile* assoziierte Diarrhoe eingeführt (<http://www.nrz-hygiene.de/surveillance/kiss/cdad-kiss/>). Bei diesen deutschlandweit (jährlich zwischen 35 und 126 deutsche Krankenhäuser) erhobenen Daten zeigte sich interessanterweise im Gegensatz zu unserer Studie seit 2007 eine weitere Zunahme der Inzidenzdichte pro 10.000 Patiententage um 0,7 (von 6,6 im Jahr 2007 auf 7,3 im Jahr 2010).

Im Vergleich mit anderen europäischen Staaten lag die Inzidenzdichte sowohl von Deutschland als auch in unserer Studie speziell am UKS deutlich über dem Durchschnitt, den die Studien von Bauer *et al.* (gewichtetes Mittel 4,1/10.000 Patiententage) und Barbut *et al.* (2,45/10.000 Patiententage) erbrachten. In beiden Studien wurde jeweils nur eine geringe Zahl an Krankenhäusern pro Staat evaluiert, wodurch die Daten möglicherweise nicht repräsentabel waren. Zudem unterschieden sich die diagnostischen Methoden in den verschiedenen europäischen Ländern, sodass die Bestimmung der Inzidenz auf der jeweiligen Spezifität und Sensitivität des angewendeten Testverfahrens beruhte (Barbut *et al.*, 2003, 2007; Bauer *et al.*, 2011). Dagegen waren die Inzidenzzahlen aus Nordamerika um ein Vielfaches höher. Der Wert lag bei der Auswertung von 7 US-amerikanischen Krankenhäusern in den Jahren 2000 bis 2003 zwischen 10,8 und

13,2 Fällen pro 10.000 Patiententage (Sohn *et al.*, 2005). Andere Studien zeigten von 2000 bis 2005 eine Verdoppelung der CDI Inzidenz, sowie eine erwartete Verdreifachung bis 2010 innerhalb dieser Dekade (McFarland *et al.*, 2007; McFarland, 2009; Zilberberg *et al.*, 2008).

Bezüglich der Patientencharakteristik zeigten sich in unserer Studie bei der Auswertung der Toxinergebnisse bis auf das Jahr 2006 ( $p < 0,05$ ) keine signifikanten Unterschiede der Toxin-positiven Befunde zwischen männlichem und weiblichem Geschlecht. Diese Daten decken sich mit einem Großteil anderer Studien aus den USA und Europa (Boone *et al.*, 2012; McDonald *et al.*, 2006; Mellace *et al.*, 2012). Bei der von Smyth *et al.* (2008) gefundenen höheren Wahrscheinlichkeit für Frauen an einer CDI zu erkranken, wird das höhere mittlere Alter diskutiert, welches einen bedeutenden Risikofaktor darstellt. Im Gegensatz zum Geschlecht spielt das Patientenalter für die Entwicklung einer CDI eine eindeutige Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass fortschreitendes Alter mit einer Zunahme der relativen Häufigkeit der CDI korreliert. Zu einem hochsignifikanter Sprung ( $p < 0,001$ ) der positiven Befunde kam es zwischen den 60- bis 70-jährigen und den 70- bis 80-jährigen. Auch zur nachfolgenden Gruppe der 80- bis 90-jährigen Patienten war nochmals eine signifikante Zunahme ( $p < 0,05$ ) der positiven Ergebnisse zu verzeichnen. Die unter 40-jährigen Patienten zusammengefasst zeigten signifikant weniger positive Befunde als die 40- bis 50-jährigen ( $p < 0,01$ ) sowie die Proben der Patienten der nachfolgenden Dekaden ( $p < 0,01$ ). In der Literatur wird ab dem 60. bis 65. Lebensjahr eine signifikant steigende Inzidenz beschrieben (Bartlett, 2006; Karlström *et al.*, 1998; Vonberg *et al.*, 2007). Ein höheres Alter geht jedoch auch mit mehr Komorbiditäten und einem längeren Krankenhausaufenthalt einher, sodass diese Faktoren die hohe Inzidenz im Alter mitbedingen (Pepin *et al.*, 2005). Bei dieser Arbeit lagen keine entsprechenden Daten vor, weswegen hierzu für den Zeitraum 2000 bis 2010 am UKS keine Rückschlüsse gezogen werden konnten.

In dieser retrospektiven Studie konnte für das Auftreten der CDI keine eindeutige saisonale Häufung gefunden werden. Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Jahreszeiten von 2000 bis 2010 waren nicht signifikant. Eine Studie aus



Südwestdeutschland wies ebenfalls eine konstante Nachweishäufigkeit von *C. difficile* über alle Monate verteilt auf (Terletskaia-Ladwig *et al.*, 2011). Dagegen zeigten andere Studien, sowohl aus Deutschland als auch aus den USA, eine Häufung der CDI in den Wintermonaten. Diese wird auf eine vermehrte Verschreibung von Antibiotika, wie Flouorchinolone und Makrolide, bei in dieser Zeit gehäuftem Auftreten von Infektionen des Respirationstrakts zurückgeführt. In verschiedenen Studien wurde ein Anstieg der CDI Inzidenz ein bis zwei Monate nach einem Influenzapeak nachgewiesen (Polgreen *et al.*, 2010; Reil *et al.*, 2011). Eine mögliche Erklärung der Inzidenzzunahme am UKS im Jahr 2007 ist der in der neunten bis zehnten Kalenderwoche dieses Jahres aufgetretene Peak der Influenzawelle, welcher deutlich über dem Vorjahr sowie dem darauffolgenden Jahr lag (Buchholz *et al.*, 2008).

Interessanterweise beschäftigten sich bisher nur sehr wenige Studien mit dem Vorkommen der CDI nach Fachbereichen analysiert. Woran dies im Detail liegt, kann nicht bestimmt werden. Die wenigen vorhandenen Studien waren auf Grund ihres Designs nicht mit unseren Daten vergleichbar. Das retrospektive Design unserer Studie erlaubte keine Berechnung von Inzidenzzahlen. In den Jahren 2000 bis 2010 waren in der vorliegenden Studie zwischen 5,7 und 18,1 % aller untersuchten Stuhlproben aller Fachabteilungen des UKS sowie der externen Einsender Toxin-positiv.

Der Mittelwert der relativen Häufigkeiten der CDI der chirurgischen Fachabteilungen (13,1 %) lag mit 4,4 % signifikant ( $p < 0,05$ ) über dem der internistischen Kliniken (8,7 %). Als Grund für eine erhöhte Inzidenz der CDI in chirurgischen Abteilungen wird die prophylaktische perioperative Antibiotikagabe diskutiert, die selbst als single-shot Antibiose einen spezifischen Risikofaktor darstellt. Privitera *et al.* (1991) zeigten eine Inzidenz der *C. difficile* Kolonisation von 17,3 % bzw. mit toxischen Stämmen von 14,4 % nach einmaliger Gabe eines Cephalosporins bzw. Mezlocillin (Crabtree *et al.*, 2007; Harbarth *et al.*, 2001; Yee *et al.*, 1991).

Die Daten aller anderer Kliniken des UKS, die Stuhlproben zur *C. difficile* Diagnostik in unser Labor gesandt haben, waren auf Grund der Diversität dieser Gruppe, die sowohl aus konservativen als auch aus operativen Disziplinen bestand, kaum beurteilbar.

Die Daten der pädiatrischen Patienten waren ebenfalls schwierig zu bewerten. Die Bedeutung der Diagnostik in dieser Patientengruppe wurde in den letzten Jahren kontrovers diskutiert. Gerade Kinder unter einem Jahr stellen eine besondere Patientengruppe dar, da hier eine hohe *C. difficile* Durchseuchungsrate vorliegt ohne dass die diagnostischen Methoden speziell für Kinder zugelassen sind und die Bedeutung der *C. difficile* Pathogenität unklar ist (Bryant *et al.*, 2009). Im Vergleich zu den anderen Fachrichtungen zeigte sich zwar ein signifikanter Unterschied zu den chirurgischen ( $p < 0,01$ ), nicht jedoch zu den internistischen Kliniken. Dieser geringe Unterschied ist mitbedingt durch die Hospitalisation von Kindern mit komplexen chronischen Erkrankungen. An oberster Stelle stehen dabei maligne Tumoren. Es folgen hämatologische, immunologische, kardiovaskuläre sowie gastrointestinale Erkrankungen. Kinder mit entzündlichen Darmerkrankungen zum Beispiel erleiden elf mal häufiger eine CDI als darmgesunde Kinder. Der Anstieg der CDI Inzidenz bei Kindern am UKS folgt einem weltweiten Trend, der sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen zu verzeichnen ist. Dagegen hat sich das Ausmaß der Erkrankungsschwere bei Kindern nicht verändert (Kim *et al.*, 2008; Nylund *et al.*, 2011; Ricciardi *et al.*, 2007). Der Schweregrad der CDI konnte in der vorliegenden Studie auf Grund des retrospektiven Designs jedoch nicht mit einbezogen werden.

Die Patienten der externen Einsender zeigten gegenüber denen der internen Einsender des UKS eine signifikant höhere relative Häufigkeit bezüglich Toxin-positiver Befunde ( $p < 0,001$ ). Der hohe Prozentsatz innerhalb dieser Gruppe ist jedoch am ehesten dadurch bedingt, dass die Stuhlproben schon vordiagnostiziert wurden und insbesondere bei schwer verlaufenden Durchfallerkrankungen erweiterten Spezialuntersuchungen in unserem Labor zugeführt werden sollten. Aber auch die weltweit steigende Zahl der ambulant erworbenen CDI kann diesen Umstand mitbedingen (Khanna *et al.*, 2012; Kuijper *et al.*, 2006). Bei der hier

durchgeführten retrospektiven Datenerhebung war eine Differenzierung zwischen ambulant und nosokomial erworbener CDI nicht möglich.

Im intensivmedizinischen Rahmen ist *Clostridium difficile* der häufigste Erreger von Durchfallerkrankungen (Liolios *et al.*, 1999). Für die CDI auf Intensivstationen wird eine Inzidenz von circa 4 % angegeben, wohingegen die Gesamtinzidenz der CDI in medizinischen Zentren bei etwa 2 % liegt. Dies wird auf die vermehrt vorliegenden Risikofaktoren der Intensivpatienten, wie z. B. intensivierte Pharmakotherapie, mechanische Beatmung oder enterale Ernährung, zurückgeführt (Lawrence *et al.*, 2007; Riddle & Dubberke, 2009). Bei der Subgruppenanalyse der Intensivpatienten am UKS zeigten sich bezüglich der relativen Häufigkeit der Toxin-positiven Befunde erstaunlicherweise keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Gesamtheit aller Fachbereiche. Die verschiedenen Fachbereiche wiesen jedoch unterschiedlich hohe Häufigkeiten auf, sodass die Zahlen der Toxin-positiven Stuhlproben zwar im Mittel keinen signifikanten Unterschied zu denen der Intensivpatienten zeigten. In den chirurgischen und anderen Kliniken sowie bei den externen Einsendern waren im Durchschnitt jedoch mehr, in den pädiatrischen Kliniken weniger Toxin-positive Befunde nachzuweisen, als auf allen Intensivstationen. Selbigen Sachverhalt zeigten bezüglich Prävalenzzahlen auch Smyth *et al.* (2008) mit einer Gesamtprävalenz der CDI von 1,21 und einem nur geringfügig höheren Wert für die Intensivstationen von 1,25. Zwischen den einzelnen Fachspezialisierungen differierten die Prävalenzen ebenfalls. Unklar war, ob die CDI auf der Intensivstation erworben wurde oder bei Verlegung bereits bestand. Dass die relativen Häufigkeiten dennoch so ähnlich waren, beruhte unter Umständen gerade wegen der größeren Zahl an Risikofaktoren der intensivmedizinisch betreuten Patienten erhöhten Aufmerksamkeit gegenüber der CDI und damit einhergehender strikter befolgter Hygienemaßnahmen.

Limitationen dieser Studie ergaben sich in erster Linie auf Grund des retrospektiven Charakters und den aus den Krankenakten nicht vollständig analysierbaren Daten bezüglich der *Clostridium difficile* Infektion, der spezifischen Symptomatik und Therapie.

Im prospektiven Teil dieser Arbeit erfolgte die *C. difficile* Diagnostik durch

verschiedene unabhängige Testmethoden, wie der Toxinantigen-Kultur und der Multiplex-PCR. Da der GLDH-Nachweis in fast allen Studien eine hohe Sensitivität von über 90 % und eine niedrige Rate an falsch positiven Befunden aufwies diente dieser als Screeningtest (Fenner *et al.*, 2008; Shetty *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2004). Die geringe Sensitivität des Toxin A/B EIA machte weitere Testmethoden zur unabhängigen Kontrolle sowie die Etablierung eines Diagnostikalgorithmus notwendig.

Für den von uns verwendeten C. diff Quik Chek Complete wurde gezeigt, dass im Vergleich zur toxischen Kultur bzw. dem CCA die Sensitivität für GLDH bei 100 % lag, wohingegen der Toxinnachweis mit 61,1 – 78,6 % nicht sehr sensitiv war. Spezifität, PPV und NPV lagen für den GLDH-Test bei 88,1 – 97,0 %, 68,2 – 93,8 % und 100 % und für den Toxin-EIA bei 96,9 – 100 %, 95,7 – 100 % und 83,8 – 97,1 %. Aus diesen Werten ergibt sich, dass im Falle eines positiven EIA-Ergebnisses für GLDH und Toxin A/B von einem richtig positiven Befund auszugehen ist und umgekehrt bei jeweils negativen Ergebnissen ein richtig negativer Befund vorhanden ist. Daher wurden in dieser Studie speziell die Proben mit positivem GLDH- und negativem Toxinnachweis weiter durch eine Multiplex-PCR untersucht, ein Vorgehen welches bereits in der Literatur diskutiert wurde (Carroll, 2011; Kawada *et al.*, 2011; Quinn *et al.*, 2010; Shetty *et al.*, 2010; Swindells *et al.*, 2010).

Basierend auf den Ergebnissen der Kultur und der Multiplex-PCR wurden die Befunde klassifiziert und eingeteilt (Tab. 4-1). Falsch negative bzw. falsch positive Befunde wurden durch mindestens zwei unabhängige Tests widerlegt. In unserer Studie zeigte die Multiplex-PCR bei 7,9 % der Proben ein falsch negatives Ergebnis für den Nachweis von *C. difficile*. Ursachen für falsch negative Befunde können eine inadäquate Lagerung des Untersuchungsmaterials oder ein Stichprobenfehler sein, da von der Stuhlprobe nur eine minimale Menge bei der PCR verwendet wird. Im Falle der PCR-positiven Stuhlproben zeigte sich, dass der Großteil der diskrepanten EIA-Befunde toxische Stämme waren. Bei 81,3 % waren Toxingene nachweisbar, deren Synthese mittels Toxin-EIA nicht nachgewiesen werden konnte. Im Vergleich mit der *C. difficile* Kultur aus nativem

Stuhlmaterial zeigten sich folgende diskrepante Befunde: mittels PCR wurde in 90,3 % trotz negativem Kulturergebnis *C. difficile* nachgewiesen. Bei den Kultur-positiven Proben waren in der PCR 7,1 % falsch negativ für *C. difficile*. Bezüglich der Toxinantigen-Kultur waren trotz negativem Antigennachweis bei knapp der Hälfte der Proben (47,6 %) Toxingene nachweisbar. Der fehlende Nachweis synthetisierter Toxine ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass viele Patienten zum Zeitpunkt der Probenabgabe schon antibiotisch anbehandelt waren, dass die Toxingene von den entsprechenden Stämmen nicht exprimiert wurden oder der Test falsch negative Ergebnisse lieferte. Bei positivem Toxinantigennachweis ergab sich in 4,5 % der Fälle ein falsch negatives Ergebnis für Toxingene in der Multiplex-PCR.

Als Goldstandard wurden die Ergebnisse der Kultur sowie der Multiplex-PCR festgelegt, sodass es per Definition keine falsch positiven Befunde gab und die Spezifität damit jeweils bei 100 % lag. Dabei ergab sich für die Kultur eine Sensitivität von 71,4 % und für die PCR von 94,9 %. Auf Grund der Auswahl der untersuchten Proben, die alle GLDH-positiv und Toxin A/B-negativ waren, war zum Einen die Berechnung des PPV und NPV nicht möglich, und zum Anderen eine direkte Vergleichbarkeit mit den Sensitivitäten und Spezifitäten anderer Studien nicht gegeben. Die generelle Sensitivität der PCR bezüglich *tcdB* bzw. *tcdA/tcdB* wurde in einer Metaanalyse mit 90 % (je nach Studie zwischen 72 und 100 %), die Spezifität mit 96 % (zwischen 88 und 100 %) gegenüber der toxigenen Kultur und dem CCA angegeben (Deshpande *et al.*, 2011).

Der in unserer Studie durchgeführte Algorithmus wurde zwar von verschiedenen Autoren postuliert, jedoch in nur wenigen Studien auf diese Art angewandt. Larson *et al.* zeigten hierfür in einem dreiteiligen Verfahren eine Sensitivität, Spezifität, PPV und NPV von 83,8 %, 99,7 %, 97,1 % und 97,9 % verglichen mit CCA und PCR. Sharp *et al.* untersuchten neben GLDH-positiven / Toxin-negativen EIA auch GLDH-negative / Toxin-positive Ergebnisse und zeigten dabei eine Sensitivität und Spezifität von 100 und 99,6 % für den mehrstufigen Algorithmus. Im Gegensatz zu der hier vorliegenden Studie wurde in den oben Genannten jedoch immer nur eine Uniplex-PCR zur Detektion des *tcdB*-Gens durchgeführt (Larson *et al.*, 2010;

Sharp *et al.*, 2010). Eine Multiplex-PCR wie wir sie verwendeten (Genotype, Hain Lifescience) ist auf Grund der Vielzahl der nachweisbaren Gene bzw. Mutationen bisher einzigartig. Neben den Toxingenen *tcdA*, *tcdB* und *cdtA/cdtB* ist es möglich drei verschiedene Deletionen des *tcdC*-Gens (18 bp- und 39bp-Deletion und 1-Basendeletion in Position 117) sowie die beiden häufigsten Mutationen des *gyrA*-Gens nachzuweisen. In der Literatur beschriebene PCR-Verfahren zur Detektion mehrerer Gene zielten in erster Linie auf die Gene für Toxin A und B ab. Sollte zudem das Gen für das binäre Toxin aufgezeigt werden, wurde entweder nur *cdtA* oder *cdtA/cdtB* nachgewiesen. Im *tcdC*-Gen wurde lediglich die Deletion an Position 117 dargestellt. Die Studie von Culbreath *et al.* (2012) war unserer vom Design ähnlich. Jedoch wurden alle GLDH-positiven Proben, unabhängig vom Toxinergebnis, weiter untersucht. Dabei ergaben sich für die Multiplex-PCR zur Detektion von *tcdB*, *cdtA* und *tcdC*-Deletion 117 eine Sensitivität, Spezifität, PPV und NPV von 98,6 %, 81,4 %, 89,7 % und 97,2 % im Vergleich zur toxigenen Kultur. Entsprechende Daten im Vergleich zum gesamten Algorithmus waren nicht angegeben.

Ein weiterer Unterschied ist die Messung der in der Multiplex-PCR erhaltenen Amplifikate. In dieser Studie erfolgte eine Hybridisierung und Farbreaktion auf Membranstreifen, was einfaches Ablesen und Dokumentieren der Befunde ermöglichte. Andere Studien verwendeten dagegen Agarosegelelektrophorese oder Fluoreszenzmessungen (Antikainen *et al.*, 2009; Barbut *et al.*, 2011; Deshpande *et al.*, 2011; Hoegh *et al.*, 2012).

Die PCR-Ergebnisse der Nativstuhlproben wurden zudem mit denen der Isolate verglichen. Dabei ergaben sich in 86,4 % identische Befunde, sodass in der Mehrzahl der Fälle das native Stuhlmaterial zur genotypischen Diagnostik ausreichte. Jedoch kann bei Befunden, die miteinander nicht vereinbare genotypische Muster aufweisen, eine Multiplex-PCR des Isolats sinnvoll sein, da die direkte PCR nicht immer zielführend ist. In dieser Studie zeigte sich bei diskrepanten Befunden, dass die Nativstuhlprobe mehr Banden auf dem Membranstreifen aufwies als das korrelierende Isolat. Das Nativmaterial scheint eine Koinfektion mit mehreren Stämmen besser zu erfassen, wohingegen die

Multiplex-PCR aus Isolaten eine höhere Sensitivität besitzt. Wir fanden in 9,1 % der Fälle eine Infektion mit verschiedenen *C. difficile* Stämmen, was mit den Ergebnissen anderer Studien korreliert, die für Mischinfektionen Häufigkeiten zwischen 8,7 und 12,8 % der untersuchten CDI Fälle angaben (Tanner *et al.*, 2010; van den Berg *et al.*, 2005). Eine weitere Ursache könnten im Rahmen von Kontaminationen während des Versuchs aber auch falsch positive Banden sein. Da die Kontrollbanden auf den Membranstreifen sich jedoch regelrecht darstellten, ist dies eher unwahrscheinlich.

Dagegen waren beim entsprechenden Isolat eindeutige Befunde ermittelbar. Der erste diskrepante Befund (A) war in der PCR aus Nativstuhl am ehesten falsch negativ für *C. difficile*. Das Ergebnis des Isolats zeigte eine Infektion mit einem nicht toxischen Stamm. Beim zweiten und dritten Befundpärchen (B und C) war von einer Koinfektion mit zwei verschiedenen *C. difficile* Stämmen auszugehen, wobei aus dem Isolat jeweils nur ein Stamm isoliert wurde. Daher waren bei B im Isolat die Gene für Toxin A und B nachweisbar und in der Nativstuhlprobe zusätzlich noch die Gene für das binäre Toxin. Das Ergebnis des Isolats ist mit dem typisierten Ribotyp 001 gut vereinbar und ist damit spezifischer als die Nativstuhlprobe. C zeigte am ehesten einen Stamm mit und einen ohne Moxifloxacinresistenz. Der diagnostizierte Ribotyp 078 weist die *tcdC*-Deletion, sichtbar auf dem Membranstreifen des Isolats, auf und spricht ebenfalls wieder für die spezifischere Detektion der Gene im Isolat.

Bei der Sequenztypisierung zeigten wir mittels Multiplex-PCR für die epidemisch relevanten Ribotypen 001, 027 und 078 Übereinstimmungen mit den für sie bekannten Genen bzw. Mutationen. Toxin- und Resistenzprofil des Ribotyps 027 korrelierte zu 100 % mit den in der Literatur beschriebenen Mutationen (Drudy *et al.*, 2007; MacCannell *et al.*, 2006; Stabler *et al.*, 2009; Warny *et al.*, 2005). Es konnte jeweils das binäre Toxin sowie Deletionen im *tcdC*-Gen und im *gyrA*-Gen detektiert werden. Ribotyp 001 zeigte bezüglich der Toxingene in 90 % der untersuchten Proben die für ihn bekannten Toxingene *tcdA* und *tcdB*. Lediglich bei einer Probe (10 %) waren zusätzlich die Gene für das binäre Toxin nachweisbar. Da *cdtA/B* für diesen Ribotypen nicht bekannt sind und im Ergebnis der Multiplex-

PCR aus dem Isolat diese Gene nicht gefunden wurden, ist von einer Koinfektion mit einem anderen *C. difficile* Stamm auszugehen. Mutationen des *gyrA*-Gens wurden in 50 % der Proben detektiert. Die von uns gezeigte Häufigkeit der Moxifloxacinresistenzgene ist damit im Vergleich niedriger als bei anderen Studien, die zwischen 83 und 100 % moxifloxacinresistente Stämme mit Hilfe des Epsilometertests fanden (Barbut *et al.*, 2007; Borgmann *et al.*, 2008; Brazier *et al.*, 2008). Bei den untersuchten Proben des Ribotyps 078 konnten die für ihn bekannten Gene für Toxin A, B und das binäre Toxin in 67 % detektiert werden. Charakteristische Deletionen des *tcdC*-Gens konnten in keinem der Fälle, *gyrA*-Mutationen lediglich in 33 % nachgewiesen werden. Erstaunlicherweise zeigten die Ergebnisse der Multiplex-PCR in 100 % der untersuchten Proben die Gene für das binäre Toxin und die bekannte *tcdC*-Deletion. Mischinfektionen mit Ribotyp 078 kommen daher möglicherweise häufiger vor als bei anderen Stämmen.

Bei den übrigen Stämmen zeigte sich ein Mischbild. Nur in 2 % der Fälle war das binäre Toxin nachweisbar. Mutationen für eine Moxifloxacinresistenz zeigten sich in 6 %, im *tcdC*-Gen in 7 % aller übrigen Ribotypen, sodass in der Mehrzahl der Fälle nicht mit einer gesteigerten Virulenz bzw. mit Fluorchinolonresistenz zu rechnen ist.

Limitationen ergaben sich in dieser experimentellen Arbeit auf Grund der geringen Probenzahl im Bezug auf die einzelnen Ribotypen.

Der Standard für die *C. difficile* Diagnostik wird zum aktuellen Zeitpunkt noch rege diskutiert. Viele Autoren empfehlen als ersten Schritt einen schnellen und kostengünstigen Test, wie den GLDH-EIA, alternativ in Kombination mit einem Toxin-EIA. Unter Umständen sollten aufwändigere Methoden wie Nukleinsäureamplifikation, toxigene Kultur oder CCA daran angeschlossen werden. Der CCA, der früher als Goldstandard galt, ist jedoch wenig standardisiert und kann damit nicht allgemein als Kontrolluntersuchung empfohlen werden. Auch die zeit-gleiche Durchführung mehrerer verschiedener Tests wird diskutiert (Carroll, 2011; Kawada *et al.*, 2011; Kufelnicka & Kirn, 2011).



Auf Grund unserer Studienergebnisse fand für den zuverlässigen Nachweis einer toxischen CDI der zweistufige Algorithmus in Form eines kombinierten GLDH- und Toxin-EIA, der im Falle von diskrepanten Befunden direkt durch eine Multiplex-PCR ergänzt werden soll, Eingang in unser Konsiliarlabor für *C. difficile* und wird nun allgemein empfohlen (Abb. 5-1). Ein alleiniger Toxin-EIA kann auf Grund der geringen Sensitivität nicht empfohlen werden. Die Anwendung einer Multiplex-PCR zur Detektion mehrere Gene ist sinnvoll, da hochvirulente Stämme, wie der Ribotyp 027, erkannt werden können. Dies ist neben epidemiologischen Fragestellungen auch für die adäquate klinische Betreuung des Patienten relevant.

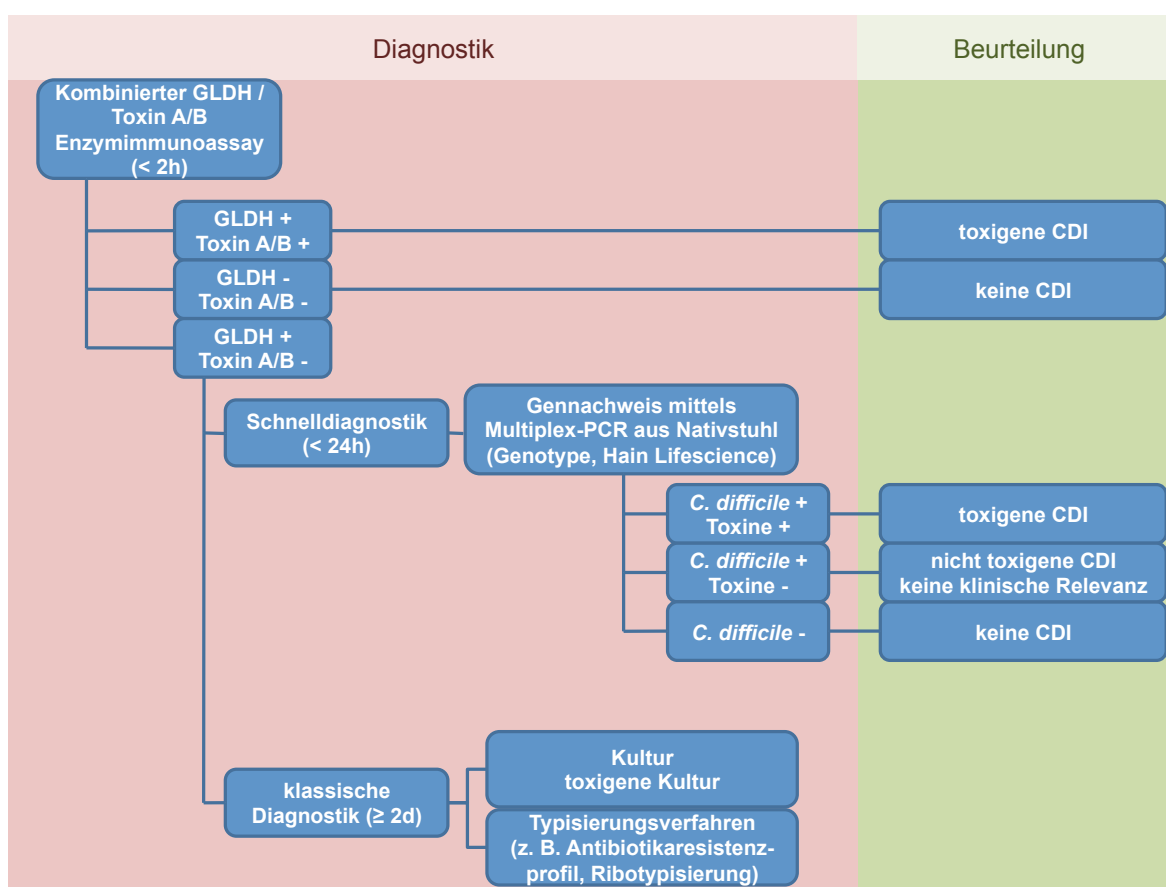


Abb. 5-1 Diagnostikalgorithmus für die toxische *C. difficile* Infektion

Zusammenfassend konnte mit Hilfe der epidemiologischen Daten der Jahre 2000 bis 2010 des UKS Folgendes gezeigt werden:

Die Inzidenz der CDI stieg am UKS bis 2007 um den Faktor 15 und sank bis 2010 wieder auf etwa die Hälfte ab. Neben der von uns verzeichneten Zunahme der Anforderungen nach einer *C. difficile* Diagnostik sowie der Entwicklung neuer Nachweismethoden, könnten möglicherweise die wachsende Aufmerksamkeit gegenüber der *C. difficile* Infektionen und veränderte Hygienemaßnahmen eine Rolle gespielt haben. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern festgestellt. Hohes Alter, insbesondere über 70 Jahre, hingegen war ein entscheidender Faktor bei der Entwicklung einer CDI. Eine jahreszeitliche Abhängigkeit des Auftretens einer CDI konnte nicht sicher gezeigt werden. Die Befunde intensivmedizinisch betreuter Patienten zeigten keine signifikanten Unterschiede zur Gesamtheit der Fachbereiche.

Ein Großteil der toxigenen *C. difficile* Infektionen konnte am UKS mit Einführung des GLDH-Suchtests 2010 innerhalb von nur circa zwei Stunden nachgewiesen werden. Dieser Test zeichnet sich im Vergleich zum alleinigen Toxinschnelltest durch eine deutlich höhere Sensitivität aus. Neben eindeutig positiven (GLDH- und Toxinnachweis positiv) und eindeutig negativen Befunden (GLDH- und Toxinnachweis negativ) können jedoch häufig auch GLDH positive und Toxin A/B negative EIA-Ergebnisse nachgewiesen werden. In diesen Fällen war mit Hilfe der anschließenden Multiplex-PCR ein Toxingennachweis innerhalb weiterer 24 Stunden möglich. Somit evaluierten wir in unserem Labor einen hochsensitiven Zwei-Stufen-Algorithmus, der sich neben Kosteneffektivität durch hohe Sensitivität, Schnelligkeit und Spezifität auszeichnet. Der damit verbundene frühzeitigere Therapiebeginn kann sich vorteilhaft auf die Prognose des Patienten auswirken. Wir empfehlen daher bei diskrepanten Ergebnissen des kombinierten GLDH-/Toxin-EIA die Durchführung der *C. difficile* PCR. Als Multiplex-PCR ist diese zugleich als Screeningmethode für hypervirulente Ribotypen geeignet. Für eine genauere genotypische Analyse der Isolate ist die toxigene Kultur notwendig.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Studie wurde der Diagnostikalgorithmus entsprechend mehrstufig verändert und wird nun am Konsiliarlabor für

*Clostridium difficile* routinemäßig durchgeführt. Er ist anderen Methoden deutlich an Sensitivität überlegen und ermöglicht innerhalb von 24 Stunden den sicheren Nachweis der toxischen *C. difficile* Infektion. Auch mit Blick auf die zunehmende Zahl an diagnostischen Anforderungen für *C. difficile*, die im retrospektiv untersuchten Zeitraum von 2000 bis 2010 gezeigt werden konnte, ist eine schnelle, rationale Diagnostik essentiell wichtig. In weiterführenden Studien sollen nun prospektiv die klinischen Befunde von *C. difficile* Patienten mit den spezifischen Charakteristika der verschiedenen *C. difficile* Stämme (z.B. Ribotyp, Toxigenität und Antibiotikaempfindlichkeit) korreliert werden, um Stämme mit besonderer Assoziation zu schweren klinischen Verläufen bzw. Rezidiven frühzeitig zu identifizieren.

## 6 Literaturverzeichnis

**Ackermann G (2004).** "Clostridium difficile – Aktueller Stand Teil I: Epidemiologie, Pathogenese, Diagnostik, Therapie, Immunologie und Prophylaxe." Mikrobiologe, 14, pp. 123-9.

**Akerlund T, Persson I, Unemo M, Norén T, Svenungsson B, Wullt M, Burman LG (2008).** "Increased sporulation rate of epidemic *Clostridium difficile* Type 027/NAP1." J Clin Microbiol, 46(4), pp. 1530-3.

**Aktories K, Wegner A (1992).** "Mechanisms of the cytopathic action of actin-ADP-ribosylating toxins." Mol Microbiol, 6(20), pp. 2905-8.

**Antikainen J, Pasanen T, Mero S, Tarkka E, Kirveskari J, Kotila S, Mentula S, Könönen E, Virolainen-Julkunen AR, Vaara M, Tissari P (2009).** "Detection of virulence genes of *Clostridium difficile* by multiplex PCR." APMIS, 117(8), pp. 607-13.

**Bannert N, Madela K (2009).** "*Clostridium difficile* NCTC 13307 (Clostridien), Bakteriengruppe. Raster-Elektronenmikroskopie." Robert Koch-Institut, [http://www.rki.de/SharedDocs/Bilder/InfAZ/Clostridium-difficile/EM\\_Tab\\_Clostridium-difficile.html](http://www.rki.de/SharedDocs/Bilder/InfAZ/Clostridium-difficile/EM_Tab_Clostridium-difficile.html) (Zugriff am 01.04.2012).

**Barbut F, Delmée M, Brazier JS, Petit JC, Poxton IR, Rupnik M, Lalande V, Schneider C, Mastrantonio P, Alonso R, Kuipjer E, Tvede M (2003).** "A European survey of diagnostic methods and testing protocols for *Clostridium difficile*." Clin Microbiol Infect, 9(10), pp. 989-96.

**Barbut F, Mastrantonio P, Delmee M, Brazier J, Kuijper E, Poxton I (2007).** "Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates." Clin Microbiol Infect, 13(11), pp. 1048–57.

**Barbut F, Monot M, Rousseau A, Cavelot S, Simon T, Burghoffer B, Lalande V, Tankovic J, Petit JC, Dupuy B, Eckert C (2011).** "Rapid diagnosis of *Clostridium difficile* infection by multiplex real-time PCR." Eur J Clin Microbiol

Infect Dis, 30(10), pp. 1279-85.

**Barth H, Aktories K, Popoff MR, Stiles BG (2004).** "Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common *Clostridium* and *Bacillus* proteins." *Microbiol Mol Biol Rev*, 68(3), pp. 373-402

**Bartlett JG (2006).** "Narrative review: the new epidemic of *Clostridium difficile*-associated enteric disease." *Ann Intern Med*, 145(10), pp. 758-64.

**Bartlett JG, Chang TW, Gurwith M, Gorbach SL, Onderdonk AB (1978).** "Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia." *N Engl J Med*, 298(10), pp. 531-4.

**Bartlett JG, Onderdonk AB, Cisneros RL, Kasper DL (1977).** "Clindamycin-associated colitis due to a toxin-producing species of *Clostridium* in hamsters." *J Infect Dis*, 136(5), pp. 701-5.

**Bauer MP, Kuijper EJ, van Dissel JT (2009).** "European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection (CDI)." *Clin Microbiol Infect*, 15(12), pp. 1067-79.

**Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH, Brazier JS, Wilcox MH, Rupnik M, Monnet DL, van Dissel JT, Kuijper EJ (2011).** "*Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey." *Lancet*, 377(9759), pp. 63-73.

**Bignardi GE (1998).** "Risk factors for *Clostridium difficile* infection." *J Hosp Infect*, 40(1), pp. 1-15.

**Bignardi GE, Settle C (2008).** "Different ribotypes in community-acquired *Clostridium difficile*." *J Hosp Infect*, 70(1), pp. 96-8.

**Birgand G, Blanckaert K, Carbonne A, Coignard B, Barbut F, Eckert C, Grandbastien B, Kadi Z, Astagneau P (2010).** "Investigation of a large outbreak of *Clostridium difficile* PCR-ribotype 027 infections in northern France, 2006-2007 and associated clusters in 2008-2009." *Euro Surveill*, 15(25), pp. 19597.

**Boone JH, Goodykoontz M, Rhodes SJ, Price K, Smith J, Gearhart KN, Carman RJ, Kerkerling TM, Wilkins TD, Lysterly DM (2012).** "*Clostridium difficile* prevalence rates in a large healthcare system stratified according to patient

population, age, gender, and specimen consistency.“ Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 31(7), pp. 1551-9.

**Borgmann S, Kist M, Jakobiak T, Reil M, Scholz E, von Eichel-Streiber C, Gruber H, Brazier JS, Schulte B (2008).** “Increased number of *Clostridium difficile* infections and prevalence of *Clostridium difficile* PCR ribotype 001 in southern Germany.” Euro Surveill, 13(49), p. 19057.

**Borriello SP (1998).** “Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection.” J Antimicrob Chemother, 41, pp. 13-9.

**Borriello SP, Honour P (1981).** “Simplified procedure for the routine isolation of *Clostridium difficile* from faeces.” J Clin Pathol, 34(10), pp. 1124-7.

**Braun V, Hundsberger T, Leukel P, Sauerborn M, von Eichel-Streiber C (1996).** “Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile*.” Gene, 181(1-2), pp. 29-38.

**Brazier JS, Raybould R, Patel B, Duckworth G, Pearson A, Charlett A, Duerden BI (2008).** “Distribution and antimicrobial susceptibility patterns of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in English hospitals, 2007-08.” Euro Surveill, 13(41), p. 19000.

**Bryant K, McDonald LC (2009).** “*Clostridium difficile* infections in children.” Pediatr Infect Dis J, 28(2), pp. 145-6.

**Buchholz U, Buda S, Grüber A, Schweiger B (2008).** “Abschlussbericht der Influenza-saison 2007/08.” Arbeitsgemeinschaft Influenza (AGI), [influenza.rki.de/Saisonberichte/2007.pdf](http://influenza.rki.de/Saisonberichte/2007.pdf) (Zugriff am 04.07.2012).

**Burns DA, Heap JT, Minton NP (2010a).** “SleC is essential for germination of *Clostridium difficile* spores in nutrient-rich medium supplemented with the bile salt taurocholate.” J Bacteriol, 192(3), pp. 657-64.

**Burns DA, Heap JT, Minton NP (2010b).** “*Clostridium difficile* spore germination: an update.” Res Microbiol, 161(9), pp. 730-4.

**Carroll KC (2011).** “Tests for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection: the next generation.” Anaerobe, 17(4), pp. 170-4.

**Carter GP, Lyras D, Allen DL, Mackin KE, Howarth PM, O'Connor JR, Rood JI (2007).** "Binary toxin production in *Clostridium difficile* is regulated by CdtR, a LytTR family response regulator." J Bacteriol, 189(20), pp. 7290-301.

**Carter GP, Rood JI, Lyras D (2012).** "The role of toxin A and toxin B in the virulence of *Clostridium difficile*." Trends Microbiol, 20(1), pp. 21-9.

**Clabots CR, Johnson S, Bettin KM, Mathie PA, Mulligan ME, Schaberg DR, Peterson LR, Gerding DN (1993).** "Development of a rapid and efficient restriction endonuclease analysis typing system for *Clostridium difficile* and correlation with other typing systems." J Clin Microbiol, 31(7), pp. 1870-5.

**Claußen K, Scharlach M, Pulz M (2011).** "Zum Vorkommen von *Clostridium difficile* in zwei Regionen Niedersachsens." Epidemiol Bull Nr. 40, pp. 363-6.

**Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, Pepin J, Wilcox MH (2010).** "Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA)." Infect Control Hosp Epidemiol, 31(5), pp. 431-55.

**Cornely OA, Crook DW, Esposito R, Poirier A, Somero MS, Weiss K, Sears P, Gorbach S (2012).** "Fidaxomicin versus vancomycin for infection with *Clostridium difficile* in Europe, Canada, and the USA: a double-blind, non-inferiority, randomised controlled trial." Lancet Infect Dis, 12(4), pp. 281-9.

**Crabtree T, Aitchison D, Meyers BF, Tymkew H, Smith JR, Guthrie TJ, Munfakh N, Moon MR, Pasque MK, Lawton J, Moazami N, Damiano RJ Jr (2007).** "*Clostridium difficile* in cardiac surgery: risk factors and impact on postoperative outcome." Ann Thorac Surg, 83(4), pp. 1396-402.

**Crobach MJ, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ (2009).** "European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI)." Clin Microbiol Infect, 15(12), pp. 1053-66.

**Culbreath K, Ager E, Nemeyer RJ, Kerr A, Gilligan PH (2012).** "Evolution of

Testing Algorithms at a University Hospital for Detection of *Clostridium difficile* Infections.“ J Clin Microbiol, 50(9), pp. 3073-6.

**Dallal RM, Harbrecht BG, Boujoukas AJ, Sirio CA, Farkas LM, Lee KK, Simmons RL (2002).** "Fulminant *Clostridium difficile*: an underappreciated and increasing cause of death and complications." Ann Surg, 235(3), pp. 363-72.

**Delmee M (1985).** "Serogrouping of *Clostridium difficile* strains by slide agglutination." J Clin Microbiol, 21, pp. 323–327.

**Delmee M (2001).** "Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease." Clin Microbiol Infect, 7(8), pp. 411-6.

**Denève C, Janoir C, Poilane I, Fantinato C, Collignon A (2009).** "New trends in *Clostridium difficile* virulence and pathogenesis." Int J Antimicrob Agents, 33(1), pp. 24-8.

**Deshpande A, Pasupuleti V, Rolston DD, Jain A, Deshpande N, Pant C, Hernandez AV (2011).** "Diagnostic accuracy of real-time polymerase chain reaction in detection of *Clostridium difficile* in the stool samples of patients with suspected *Clostridium difficile* Infection: a meta-analysis." Clin Infect Dis, 53(7), pp. 81-90.

**Dial S, Delaney JA, Barkun AN, Suissa S (2005).** "Use of gastric acid-suppressive agents and the risk of community-acquired *Clostridium difficile*-associated disease." JAMA, 294(23), pp. 2989-95.

**Drudy D, Kyne L, O'Mahony R, Fanning S (2007).** "gyrA mutations in fluoroquinolone-resistant *Clostridium difficile* PCR-027." Emerg Infect Dis, 13(3), pp. 504-5.

**Edwards MC, Gibbs RA (1994).** "Multiplex PCR: advantages, development, and applications." PCR Methods Appl, 3(4), pp. 65-75.

**Fenner L, Widmer AF, Goy G, Rudin S, Frei R (2008).** "Rapid and reliable diagnostic algorithm for detection of *Clostridium difficile*." J Clin Microbiol, 46(1), pp. 328-30.

**Gastmeier P, Weitzel-Kage D, Behnke M, Eckmanns T (2009).** "Surveillance of



*Clostridium difficile*-associated diarrhoea with the German nosocomial infection surveillance system KISS (CDAD-KISS).“ Int J Antimicrob Agents, 33 (1), pp. 19-23.

**George WL, Sutter VL, Citron D, Finegold SM (1979).** "Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*." J Clin Microbiol, 9(2), pp. 214-9.

**Gerding DN, Muto CA, Owens RC Jr (2008).** "Treatment of *Clostridium difficile* infection." Clin Infect Dis, 46(1), pp. 32-42.

**Giel JL, Sorg JA, Sonenshein AL, Zhu J (2010).** "Metabolism of bile salts in mice influences spore germination in *Clostridium difficile*." PLoS One, 5(1), p. 8740.

**Goorhuis A, Bakker D, Corver J, Debast SB, Harmanus C, Notermans DW, Bergwerff AA, Dekker FW, Kuijper EJ (2008).** "Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078." Clin Infect Dis, 47(9), pp. 1162-70.

**Hafiz S, Oakley CL (1976).** "*Clostridium difficile*: isolation and characteristics." J Med Microbiol, 9(2), pp. 129-36.

**Harbarth S, Samore MH, Carmeli Y (2001).** "Antibiotic prophylaxis and the risk of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea." J Hosp Infect, 2001, 48(2), pp. 93-7.

**Heard SR, Rasburn B, Matthews RC, Tabaqchali S (1986).** "Immunoblotting to demonstrate antigenic and immunogenic differences among nine standard strains of *Clostridium difficile*." J. Clin Microbiol, 24, pp. 284–287.

**Henrich TJ, Krakower D, Bitton A, Yokoe DS (2009).** "Clinical risk factors for severe *Clostridium difficile*-associated disease." Emerg Infect Dis, 15(3), pp. 415-22.

**Hoegh AM, Nielsen JB, Lester A, Friis-Møller A, Schønning K (2012).** "A multiplex, internally controlled real-time PCR assay for detection of toxigenic *Clostridium difficile* and identification of hypervirulent strain 027/ST-1." Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 31(6), pp. 1073-9.

**Indra A, Huhulescu S, Schneeweis M, Hasenberger P, Kernbichler S, Fiedler**

**A, Wewalka G, Allerberger F, Kuijper EJ (2008).** "Characterization of *Clostridium difficile* isolates using capillary gel electrophoresis-based PCR ribotyping." J Med Microbiol, 57(11), pp. 1377-82.

**Jansen A, Kleinkauf N, Weiss B, Zaiss NH, Witte W, Bornhofen B, Kist M, von Eichel-Streiber C, Neumann M, Michels H, Eckmanns T (2010).** "Emergence of *Clostridium difficile* ribotype 027 in Germany: epidemiological and clinical characteristics." Z Gastroenterol, 48(9), pp. 1120-5.

**Kallen AJ, Thompson A, Ristaino P, Chapman L, Nicholson A, Sim BT, Lessa F, Sharapov U, Fadden E, Boehler R, Gould C, Limbago B, Blythe D, McDonald LC (2009).** "Complete restriction of fluoroquinolone use to control an outbreak of *Clostridium difficile* infection at a community hospital." Infect Control Hosp Epidemiol, 30(3), pp. 264-72.

**Karjalainen T, Waligora-Dupriet AJ, Cerquetti M, Spigaglia P, Maggioni A, Mauri P, Mastrantonio P (2001).** "Molecular and genomic analysis of genes encoding surface-anchored proteins from *Clostridium difficile*." Infect Immun, 69(5), pp. 3442-6.

**Karlström O, Fryklund B, Tullus K, Burman LG (1998).** "A prospective nationwide study of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in Sweden. The Swedish *C. difficile* Study Group." Clin Infect Dis, 26(1), pp. 141-5.

**Kato H, Kato N, Watanabe K, Yamamoto T, Suzuki K, Ishigo S, Kunihiro S, Nakamura I, Killgore GE, Nakamura S (2001).** "Analysis of *Clostridium difficile* isolates from nosocomial outbreaks at three hospitals in diverse areas of Japan." J Clin Microbiol, 39(4), pp. 1391-5.

**Kawada M, Annaka M, Kato H, Shibasaki S, Hikosaka K, Mizuno H, Masuda Y, Inamatsu T (2011).** "Evaluation of a simultaneous detection kit for the glutamate dehydrogenase antigen and toxin A/B in feces for diagnosis of *Clostridium difficile* infection." J Infect Chemother, 17(6), pp. 807-11.

**Keel K, Brazier JS, Post KW, Weese S, Songer JG (2007).** "Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species." J Clin Microbiol, 45(6), pp. 1963-4.

**Kelly CP, LaMont JT (2008).** “*Clostridium difficile* - more difficult than ever.” N Engl J Med, 359(18), pp. 1932-40.

**Khanna S, Pardi DS, Aronson SL, Kammer PP, Orenstein R, St Sauver JL, Harmsen WS, Zinsmeister AR (2012).** “The epidemiology of community-acquired *Clostridium difficile* infection: a population-based study.” Am J Gastroenterol, 107(1), pp. 89-95.

**Killgore G, Thompson A, Johnson S, Brazier J, Kuijper E, Pepin J, Frost EH, Savelkoul P, Nicholson B, van den Berg RJ, Kato H, Sambol SP, Zukowski W, Woods C, Limbago B, Gerding DN, McDonald LC (2008).** “Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing.” J Clin Microbiol, 46(2), pp. 431-7.

**Kim J, Smathers SA, Prasad P, Leckerman KH, Coffin S, Zaoutis T (2008).** “Epidemiological features of *Clostridium difficile*-associated disease among inpatients at children's hospitals in the United States, 2001-2006.” Pediatrics, 122(6), pp. 1266-70.

**Kufelnicka AM, Kirn TJ (2011).** “Effective utilization of evolving methods for the laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection.” Clin Infect Dis, 52(12), pp. 1451-7.

**Kuijper EJ, Barbut F, Brazier JS, Kleinkauf N, Eckmanns T, Lambert ML, Drudy D, Fitzpatrick F, Wiuff C, Brown DJ, Coia JE, Pituch H, Reichert P, Even J, Mossong J, Widmer AF, Olsen KE, Allerberger F, Notermans DW, Delmée M, Coignard B, Wilcox M, Patel B, Frei R, Nagy E, Bouza E, Marin M, Akerlund T, Virolainen-Julkunen A, Lyytikäinen O, Kotila S, Ingebrechtsen A, Smyth B, Rooney P, Poxton IR, Monnet DL (2008).** “Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008.” Euro Surveill, 13(31), p. 18942.

**Kuijper EJ, Coignard B, Tüll P (2006).** “Emergence of *Clostridium difficile*-

associated disease in North America and Europe.“ Clin Microbiol Infect, 12(6), pp. 2-18.

**Kutty PK, Woods CW, Sena AC, Benoit SR, Naggie S, Frederick J, Evans S, Engel J, McDonald LC (2010).** “Risk factors for and estimated incidence of community-associated *Clostridium difficile* infection, North Carolina, USA.” Emerg Infect Dis, 16(2), pp. 197-204.

**Labbé AC, Poirier L, Maccannell D, Louie T, Savoie M, Béliveau C, Laverdière M, Pépin J (2008).** “*Clostridium difficile* infections in a Canadian tertiary care hospital before and during a regional epidemic associated with the BI/NAP1/027 strain.” Antimicrob Agents Chemother, 52(9), pp. 3180-7.

**Larson AM, Fung AM, Fang FC (2010).** “Evaluation of tcdB real-time PCR in a three-step diagnostic algorithm for detection of toxigenic *Clostridium difficile*.” J Clin Microbiol, 48(1), pp. 124-30.

**Lawrence SJ, Puzniak LA, Shadel BN, Gillespie KN, Kollef MH, Mundy LM (2007).** “*Clostridium difficile* in the intensive care unit: epidemiology, costs, and colonization pressure.” Infect Control Hosp Epidemiol, 28(2), pp. 123-30.

**Liolios A, Oropello JM, Benjamin E (1999).** “Gastrointestinal complications in the intensive care unit.” Clin Chest Med, 20(2), pp. 329-45.

**Louie TJ, Miller MA, Mullane KM, Weiss K, Lentnek A, Golan Y, Gorbach S, Sears P, Shue YK (2011).** “Fidaxomicin versus vancomycin for *Clostridium difficile* infection.” N Engl J Med, 364(5), pp. 422-31.

**MacCannell DR, Louie TJ, Gregson DB, Laverdiere M, Labbe AC, Laing F, Henwick S (2006).** “Molecular analysis of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 isolates from Eastern and Western Canada.” J Clin Microbiol, 44(6), pp. 2147-52.

**Mani N, Dupuy B (2001).** “Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor.” Proc Natl Acad Sci U S A, 98(10), pp. 5844-9.

**Matamouros S, England P, Dupuy B (2007).** “*Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC.” Mol Microbiol, 64(5), pp.

1274-88.

**McDonald LC, Owings M, Jernigan DB (2006).** “*Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996-2003.” *Emerg Infect Dis*, 12(3), pp. 409-15.

**McFarland LV (2008).** “Update on the changing epidemiology of *Clostridium difficile*-associated disease.” *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 5(1), pp. 40-8.

**McFarland LV (2009).** “Renewed interest in a difficult disease: *Clostridium difficile* infections--epidemiology and current treatment strategies.” *Curr Opin Gastroenterol*, 25(1), pp. 24-35.

**McFarland LV, Clarridge JE, Beneda HW, Raugi GJ (2007).** “Fluoroquinolone use and risk factors for *Clostridium difficile*-associated disease within a Veterans Administration health care system.” *Clin Infect Dis*, 45(9), pp. 1141-51.

**McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RY, Stamm WE (1989).** “Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection.” *N Engl J Med*, 320(4), pp. 204-10.

**Mellace L, Consonni D, Jacchetti G, Del Medico M, Colombo R, Velati M, Formica S, Cappellini MD, Castaldi S, Fabio G (2012).** “Epidemiology of *Clostridium difficile*-associated disease in internal medicine wards in northern Italy.” *Intern Emerg Med*, [Epub ahead of print].

**Muto CA, Pokrywka M, Shutt K, Mendelsohn AB, Nouri K, Posey K, Roberts T, Croyle K, Krystofiak S, Patel-Brown S, Pasculle AW, Paterson DL, Saul M, Harrison LH (2005).** “A large outbreak of *Clostridium difficile*-associated disease with an unexpected proportion of deaths and colectomies at a teaching hospital following increased fluoroquinolone use.” *Infect Control Hosp Epidemiol*, 26(3), pp. 273-80.

**Nelson RL, Kelsey P, Leeman H, Meardon N, Patel H, Paul K, Rees R, Taylor B, Wood E, Malakun R (2011).** “Antibiotic treatment for *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults.” *Cochrane Database Syst Rev*, 9, CD004610.

**Norén T, Akerlund T, Bäck E, Sjöberg L, Persson I, Alriksson I, Burman LG (2004).** „Molecular epidemiology of hospital-associated and community-acquired

*Clostridium difficile* infection in a Swedish county." J Clin Microbiol, 42(8), pp. 3635-43.

**Nylund CM, Goudie A, Garza JM, Fairbrother G, Cohen MB (2011).** "*Clostridium difficile* infection in hospitalized children in the United States." Arch Pediatr Adolesc Med, 165(5), pp. 451-7.

**O'Donoghue C, Kyne L (2011).** "Update on *Clostridium difficile* infection." Curr Opin Gastroenterol, 27(1), pp. 38-47.

**Pépin J, Saheb N, Coulombe MA, Alary ME, Corriveau MP, Authier S, Leblanc M, Rivard G, Bettez M, Primeau V, Nguyen M, Jacob CE, Lanthier L (2005).** "Emergence of fluoroquinolones as the predominant risk factor for *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a cohort study during an epidemic in Quebec." Clin Infect Dis, 41(9), pp. 1254-60.

**Pépin J, Valiquette L, Alary ME, Villemure P, Pelletier A, Forget K, Pépin K, Chouinard D (2004).** "*Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity." CMAJ, 171(5), pp. 466-72.

**Perelle S, Gibert M, Bourlioux P, Corthier G, Popoff MR (1997).** "Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD196." Infect Immun, 65(4), pp. 1402-7.

**Persson S, Jensen JN, Olsen KE (2011).** "Multiplex PCR method for detection of *Clostridium difficile* tcdA, tcdB, cdtA, and cdtB and internal in-frame deletion of tcdC." J Clin Microbiol, 49(12), pp. 4299-300.

**Pituch H, van Leeuwen W, Maquelin K, Wultańska D, Obuch-Woszczatyński P, Nurzyńska G, Kato H, Reijans M, Meisel-Mikołajczyk F, Łuczak M, van Belkum A (2007).** "Toxin profiles and resistances to macrolides and newer fluoroquinolones as epidemicity determinants of clinical isolates of *Clostridium difficile* from Warsaw, Poland." J Clin Microbiol, 45(5), pp. 1607-10.

**Polgreen PM, Yang M, Bohnett LC, Cavanaugh JE (2010).** "A time-series analysis of *clostridium difficile* and its seasonal association with influenza." Infect

Control Hosp Epidemiol, 31(4), pp. 382-7.

**Popoff MR, Rubin EJ, Gill DM, Boquet P (1988).** "Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain." Infect Immun, 56(9), pp. 2299-306.

**Pothoulakis C, Lamont JT (2001).** "Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions II. The integrated response of the intestine to *Clostridium difficile* toxins." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 280(2), pp. 178-83.

**Privitera G, Scarpellini P, Ortisi G, Nicastro G, Nicolin R, de Lalla F (1991).** "Prospective study of *Clostridium difficile* intestinal colonization and disease following single-dose antibiotic prophylaxis in surgery." Antimicrob Agents Chemother, 35(1), pp. 208-10.

**Quinn CD, Sefers SE, Babiker W, He Y, Alcabasa R, Stratton CW, Carroll KC, Tang YW (2010).** "C. Diff Quik Chek complete enzyme immunoassay provides a reliable first-line method for detection of *Clostridium difficile* in stool specimens." J Clin Microbiol, 48(2), pp. 603-5.

**Reil M, Hensgens MP, Kuijper EJ, Jakobiak T, Gruber H, Kist M, Borgmann S (2011).** "Seasonality of *Clostridium difficile* infections in Southern Germany." Epidemiol Infect, 8, pp. 1-7.

**Reineke J, Tenzer S, Rupnik M, Koschinski A, Hasselmayer O, Schrattenholz A, Schild H, von Eichel-Streiber C (2007).** „Autocatalytic cleavage of *Clostridium difficile* toxin B." Nature, 446(7134), pp. 415-9.

**Ricciardi R, Rothenberger DA, Madoff RD, Baxter NN (2007).** "Increasing prevalence and severity of *Clostridium difficile* colitis in hospitalized patients in the United States." Arch Surg, 142(7), pp. 624-31.

**Riddle DJ, Dubberke ER (2009).** "*Clostridium difficile* infection in the intensive care unit." Infect Dis Clin North Am, 23(3), pp. 727-43.

**Rupnik M (2008).** "Heterogeneity of large clostridial toxins: importance of *Clostridium difficile* toxinotypes." FEMS Microbiol Rev, 32(3), pp. 541-55.

**Rupnik M, Grabnar M, Geric B (2003).** "Binary toxin producing *Clostridium difficile* strains." *Anaerobe*, 9(6), pp. 289-94.

**Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN (2009).** "*Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis." *Nat Rev Microbiol*, 7(7), pp. 526-36.

**Salyers AA, Shoemaker NB, Stevens AM, Li LY (1995).** "Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements." *Microbiol Rev*, 59(4), pp. 579-90.

**Schmidt ML, Gilligan PH (2009).** "*Clostridium difficile* testing algorithms: what is practical and feasible?" *Anaerobe*, 15(6), pp. 270-3.

**Schneider T, Eckmanns T, Ignatius R, Weist K, Liesenfeld O (2007).** "*Clostridium-difficile*-assoziierte Diarrhö - Ein zunehmendes klinisches Problem durch neue hochvirulente Erreger." *Dtsch Arztebl*, 104(22), pp. 1588–94.

**Shah D, Dang MD, Hasbun R, Koo HL, Jiang ZD, DuPont HL, Garey KW (2010).** "*Clostridium difficile* infection: update on emerging antibiotic treatment options and antibiotic resistance." *Expert Rev Anti Infect Ther*, 8(5), pp. 555-64.

**Sharp SE, Ruden LO, Pohl JC, Hatcher PA, Jayne LM, Ivie WM (2010).** "Evaluation of the C.Diff Quik Chek Complete Assay, a new glutamate dehydrogenase and A/B toxin combination lateral flow assay for use in rapid, simple diagnosis of *clostridium difficile* disease." *J Clin Microbiol*, 48(6), pp. 2082-6.

**Shetty N, Wren MW, Coen PG (2011).** "The role of glutamate dehydrogenase for the detection of *Clostridium difficile* in faecal samples: a meta-analysis." *J Hosp Infect*, 77(1), pp. 1-6.

**Simor AE (2010).** "Diagnosis, management, and prevention of *Clostridium difficile* infection in long-term care facilities: a review." *J Am Geriatr Soc*, 58(8), pp. 1556-64.

**Smyth ET, McIlvenny G, Enstone JE, Emmerson AM, Humphreys H, Fitzpatrick F, Davies E, Newcombe RG, Spencer RC (2008).** "Four country



healthcare associated infection prevalence survey 2006: overview of the results.“ J Hosp Infect, 69(3), pp. 230-48.

**Sohn S, Climo M, Diekema D, Fraser V, Herwaldt L, Marino S, Noskin G, Perl T, Song X, Tokars J, Warren D, Wong E, Yokoe DS, Zembower T, Sepkowitz KA (2005).** “Varying rates of *Clostridium difficile*-associated diarrhea at prevention epicenter hospitals.“ Infect Control Hosp Epidemiol, 26(8), pp. 676-9.

**Sorg JA, Sonenshein AL (2008).** “Bile salts and glycine as cogermnants for *Clostridium difficile* spores.” J Bacteriol, 190(7), pp. 2505-12.

**Sorg JA, Sonenshein AL (2009).** “Chenodeoxycholate is an inhibitor of *Clostridium difficile* spore germination.” J Bacteriol, 191(3), pp. 1115-7.

**Spigaglia P, Carucci V, Barbanti F, Mastrantonio P (2005).** “ErmB Determinants and Tn916-Like Elements in Clinical Isolates of *Clostridium difficile*.” Antimicrob Agents Chemother, 49(6), pp. 2550–3.

**Stabler RA, Gerding DN, Songer JG, Drudy D, Brazier JS, Trinh HT, Witney AA, Hinds J, Wren BW (2006).** “Comparative phylogenomics of *Clostridium difficile* reveals clade specificity and microevolution of hypervirulent strains.” J Bacteriol, 188(20), pp. 7297-305.

**Stabler RA, He M, Dawson L, Martin M, Valiente E, Corton C, Lawley TD, Sebahia M, Quail MA, Rose G, Gerding DN, Gibert M, Popoff MR, Parkhill J, Dougan G, Wren BW (2009).** “Comparative genome and phenotypic analysis of *Clostridium difficile* 027 strains provides insight into the evolution of a hypervirulent bacterium.” Genome Biol, 10(9), p.102.

**Swindells J, Brenwald N, Reading N, Oppenheim B (2010).** “Evaluation of diagnostic tests for *Clostridium difficile* infection.” J Clin Microbiol, 48(2), pp. 606-8.

**Tan KS, Wee BY, Song KP (2001).** „Evidence for holin function of tcdE gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*.“ J Med Microbiol, 50(7), pp. 613-9.

**Tanner HE, Hardy KJ, Hawkey PM (2010).** “Coexistence of multiple multilocus variable-number tandem-repeat analysis subtypes of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 strains within fecal specimens.“ J Clin Microbiol, 48(3), pp. 985-7.

- Tannock GW, Munro K, Taylor C, Lawley B, Young W, Byrne B, Emery J, Louie T (2010).** "A new macrocyclic antibiotic, fidaxomicin (OPT-80), causes less alteration to the bowel microbiota of *Clostridium difficile*-infected patients than does vancomycin." *Microbiology*, 156(11), pp. 3354-9.
- Tasteyre A, Barc MC, Collignon A, Boureau H, Karjalainen T (2001).** "Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization." *Infect Immun*, 69(12), pp. 7937-40.
- Terhes G, Brazier JS, Urbán E, Sóki J, Nagy E (2006).** "Distribution of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in regions of Hungary." *J Med Microbiol*, 55(3), pp. 279-82.
- Terletskaia-Ladwig E, Eggers M, Enders M, Regnath T (2011).** "Epidemiologische Aspekte gastrointestinaler Infektionen." *Dtsch Med Wochenschr*, 136(3), pp. 69-75.
- Thompson I (2008).** "*Clostridium difficile*-associated disease: update and focus on non-antibiotic strategies." *Age Ageing*, 37(1), pp. 14-8.
- Vaishnavi C (2010).** "Clinical spectrum & pathogenesis of *Clostridium difficile* associated diseases." *Indian J Med Res*, 131, pp. 487-99.
- Valiquette L, Low DE, Pépin J, McGeer A (2004).** "*Clostridium difficile* infection in hospitals: a brewing storm." *CMAJ*, 171(1), pp. 27-9.
- van den Berg RJ, Ameen HA, Furusawa T, Claas EC, van der Vorm ER, Kuijper EJ (2005).** "Coexistence of multiple PCR-ribotype strains of *Clostridium difficile* in faecal samples limits epidemiological studies." *J Med Microbiol*, 54(2), pp. 173-9.
- van den Berg RJ, Schaap I, Templeton KE, Klaassen CH, Kuijper EJ (2007).** "Typing and subtyping of *Clostridium difficile* isolates by using multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis." *J Clin Microbiol*, 45(3), pp. 1024-8.
- Vonberg RP, Gastmeier P (2008).** "*Clostridium-difficile*-assoziierte Diarrhö: Zunehmende Inzidenz in Deutschland." *Epidemiol Bull* Nr. 15, p. 119.
- Vonberg RP, Schwab F, Gastmeier P (2007).** "*Clostridium difficile* in discharged

inpatients.” *Emerg Infect Dis*, 13(1), pp. 179-80.

**Voth DE, Ballard JD (2005).** “*Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease.” *Clin Microbiol Rev*, 18(2), pp. 247-63.

**Warny M, Pepin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, Brazier J, Frost E, McDonald LC (2005).** “Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe.” *Lancet*, 366(9491), pp. 1079-84.

**Wilcox MH, Fawley WN, Parnell P (2000).** “Value of lysozyme agar incorporation and alkaline thioglycollate exposure for the environmental recovery of *Clostridium difficile*.” *J Hosp Infect*, 44(1), pp. 65-9.

**Yee J, Dixon CM, McLean AP, Meakins JL (1991).** “*Clostridium difficile* disease in a department of surgery. The significance of prophylactic antibiotics.” *Arch Surg*, 126(2), pp. 241-6.

**Zaiss NH, Weile J, Ackermann G, Kuijper EJ, Witte W, Nübel U (2007).** “A case of *Clostridium difficile*-associated disease due to the highly virulent clone of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027, March 2007 in Germany.” *Euro Surveill*, 12(46), p. 3306.

**Zaiss NH, Witte W, Nübel U (2010).** “Fluoroquinolone resistance and *Clostridium difficile*, Germany.” *Emerg Infect Dis*, 16(4), pp. 675-7.

**Zar FA, Bakkanagari SR, Moorthi KM, Davis MB (2007).** “A comparison of vancomycin and metronidazole for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea, stratified by disease severity.” *Clin Infect Dis*, 45(3), pp. 302-7.

**Zheng L, Keller SF, Lyerly DM, Carman RJ, Genheimer CW, Gleaves CA, Kohlhepp SJ, Young S, Perez S, Ye K (2004).** “Multicenter evaluation of a new screening test that detects *Clostridium difficile* in fecal specimens.” *J Clin Microbiol*, 42(8), pp. 3837-40.

**Zilberberg MD, Shorr AF, Kollef MH (2008).** “Increase in adult *Clostridium difficile*-related hospitalizations and case-fatality rate, United States, 2000-2005.” *Emerg Infect Dis*, 14(6), pp. 929-31.

## 7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben:

Insbesondere bei Herrn PD Dr. Lutz von Müller, für die Möglichkeit und das Vertrauen, dieses Thema erarbeiten zu dürfen. Die stete engagierte Betreuung, ob vor Ort oder aus der Ferne, sowie das Interesse am Fortschritt der Studie waren für das Gelingen der Arbeit eine unerlässliche Hilfe.

Frau Dr. Birgit Herbert, für die kompetente Unterstützung und Hilfestellung bei Problemen der experimentellen Arbeit.

Herrn Dr. Alexander Halfmann und Herrn Richard Schaum, für die Hilfe bei der retrospektiven Datenerhebung.

Für die gute Einweisung in die verschiedenen Arbeitstechniken im PCR-Labor danke ich Sabine Freis und Susanne Loibl.

Zuletzt möchte ich mich noch bei meinen Eltern, die mir mein Studium überhaupt erst ermöglicht haben, bedanken. Dank geht auch an meine Schwester Romy und meine Freunde, die jederzeit ein offenes Ohr hatten und mich mit Rat und Tat unterstützt und immer wieder ermutigt haben.

## 8 Lebenslauf